

REVISIONES

Fragmentación del ADN espermático

Jaime Gosálvez Berenguer^a, Pedro Caballero Peregrín^b, C. López-Fernández^b, J.L. Fernández^c
y Rocío Núñez Calonge^b

^aUnidad de Genética. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

^bClínica Tambre. Madrid. España.

^cUnidad de Genética. INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña. España.

RESUMEN

Los valores de fragmentación de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) transportada por el espermatozoide y su relación con la fertilidad, es un tema de enorme interés, tanto en humanos como en el resto de las especies, dado el papel implícito que se le otorga al ADN en el momento de producir una descendencia que, dentro de unos límites, represente el acervo genético de los genomas parentales. Sin embargo, el estudio de cuán fragmentado se encuentra el ADN del espermatozoide no es una tarea sencilla debido a que la evolución ha blindado la información genética para ser transportada, haciéndola poco accesible a todo tipo de factores externos que puedan modificar el sentido real del mensaje que se intenta transmitir. En el presente trabajo se presenta una reflexión, en tono de cuestiones abiertas, acerca de distintos aspectos de la fragmentación del ADN espermático que pretende ordenar el tono del debate sobre un problema, ya no sólo apasionante sino también de un enorme interés práctico. De esta forma se formulan y se debaten las siguientes cuestiones: ¿cuáles son los mecanismos que provocan fragmentación del ADN espermático?; ¿se relaciona la fragmentación del ADN espermático con determinados cuadros clínicos?; ¿qué factores externos incrementan los valores de fragmentación del ADN espermático?; ¿cuáles son las lesiones que se esperan en el ADN del espermatozoide?; ¿es correcta la distinción entre roturas "reales" frente a roturas "potenciales" del ADN?; ¿qué metodología es más efectiva para medir el daño en el ADN del espermatozoide?; ¿se debe hablar de metodologías directas e indirectas para analizar el daño en el espermatozoide?; ¿qué consecuencias tienen los distintos tipos de daño en la fertilización?; ¿es esencial distinguir la localización de las roturas del ADN en áreas codificantes o no codificantes? En una serie de apartados finales se generan preguntas más relacionadas con la aplicación clínica como: ¿hay un nivel de corte para conseguir embarazo y un "efecto iceberg"?; ¿cuál es el límite aceptable para relacionar la fragmentación del ADN con la fertilidad?, o bien ¿respalda la clínica las hipótesis planteadas sobre los valores de fragmentación y fertilidad?; ¿es clínicamente aceptable considerar los valores de fragmentación como un valor único y estático? Finalmente, y ante toda la serie de problemas que parece se pueden derivar de transmitir o intentar transmitir una molécula de ADN no ortodoxa a la descendencia, una pregunta final en tono de posible solución al pro-

ABSTRACT

Of sperm DNA fragmentation

Sperm DNA fragmentation and its relationship to fertility is a topic of great interest, not only in humans but in all species, given the implicit role of the DNA molecule in producing a successful offspring with a genetic resemblances to the parental genomes. However, sperm DNA fragmentation is not easy, mainly because the evolutionary trends have shielded the genetic information to external factors that could affect the genetic message. The present study presents some open questions on different aspects of the sperm DNA fragmentation as an open debate about an exciting issue with a high practical interest. The following questions shall be addressed and discussed: what are the mechanisms that cause sperm DNA fragmentation? Is Sperm DNA fragmentation related to certain clinical conditions? What factors are increasing the level of sperm DNA fragmentation? Which kind of damage it is expected on the sperm DNA? Is a distinction between "real" versus "potential" DNA damage possible? What is most successful methodology for assessing sperm DNA fragmentation? Is it relevant to talk about "direct" and "indirect" methods for analyzing sperm DNA damage? What are the consequences for fertilization of different types of sperm DNA damage? Is it crucial to map the sperm DNA damage in coding or non-coding areas? Some questions directly related to the clinical applications have been addressed; is there a threshold level to achieve pregnancy and an "iceberg effect"? Is fertility related to a known level of sperm DNA fragmentation? Are the results at clinic level supporting the assumptions about the sperm DNA fragmentation and fertility? Is sperm DNA fragmentation and static or a dynamic concept? And one obvious final question; is there a treatment to decrease the levels of sperm DNA fragmentation? One of the main aims of this review is to identify those aspects where each one of us need to act, in our day-to-day work, by seeking solutions which will bring us nearer to answering these questions and increasing general knowledge.

Key words: Andrology. Sperm DNA fragmentation. Spermatozoid. Sperm quality. Fertility. Male factor.

Correspondencia: Dr. J. Gosálvez Berenguer.
Unidad de Genética. Departamento de Biología.
Universidad Autónoma de Madrid.
Darwin, s/n. 28049 Cantoblanco. Madrid. España.
Correo electrónico: jaime.gosalvez@uam.es

blema sería: ¿hay un tratamiento que disminuya los valores de fragmentación del ADN espermático? La presente revisión, con un acento no oculto de reflexión personal, trata, simplemente, que seamos conscientes de todo lo que se desconoce en el mundo de la fragmentación del ADN dentro de la célula automóvil conocida como espermatozoide, para poder identificar los aspectos en los que cada uno de nosotros podamos aportar nuestra mejor parte del conocimiento para que las preguntas cada día sean muchas menos o, al menos, de menor calado.

Palabras clave: Andrología. Fragmentación del ADN espermático. Espermatozoide. Calidad espermática. Fertilidad. Factor masculino.

INTRODUCCIÓN

¿Qué espermatozoide piensa usted que tendrá más éxito reproductivo: uno que tenga el ADN íntegro o uno que lo tenga fragmentado? Si pidiéramos opinión acerca de esta cuestión a cualquier profano en el campo de la reproducción, casi con toda seguridad la respuesta sería: “pues, el espermatozoide que tiene su ADN íntegro”. Sin embargo, esta conclusión, no carente de cierta lógica –*lo roto no funciona*–, no parece que sea asumible por la ciencia, y el profesional relacionado con la práctica médica o con la investigación necesita pruebas experimentales que respalden lo que la lógica del profano asume con facilidad. El problema que suele acompañar al científico es que, al formular nuevas preguntas acerca de algo desconocido, genera otras tantas de igual calado respecto a otros aspectos que también desconoce. Nada en la ciencia escapa a esta regla, dado que si así fuera, la ciencia, como tal, dejaría de serlo. Dentro de este escenario, el dar respuesta, por parte del científico, a una cuestión como la anteriormente formulada y en relación con la calidad del ADN en el espermatozoide, y que el profano vislumbra con nitidez, genera toda suerte de dudas y preguntas que, desgraciadamente, no siempre tienen una respuesta tan inmediata como sería deseable. Pero, como decíamos antes, es el desconocimiento, como motor de la ciencia, el que genera toda una serie de dudas cuya resolución siempre llevarán implícito un paso adelante en la comprensión global del problema.

El espermatozoide es una célula singular, autónoma en parte de su existencia y la encargada de mantener la identidad de las especies dado que aporta casi el 50% de la carga genética nuclear que caracteriza a un organismo diploide. Además, el espermatozoide, durante el proceso de fecundación, sólo aporta la carga genética al nuevo embrión, ya que la mayoría del citoplasma de esta célula se pierde durante su proceso de maduración. Será el citoplasma del oocito el que aporta las

primeras señales para el control de la expresión genética del genoma aportado por el varón. Con independencia de estas singularidades, las células espermáticas de todas las especies están específicamente diseñadas para garantizar la transmisión de un genoma haploide íntegro que conforme un nuevo individuo, que a su vez se comportará como nuevo reproductor, y así perpetuar las especies. Por lo tanto, la integridad del genoma en un espermatozoide es casi una exigencia para el desarrollo normal de un embrión, para el éxito de embarazo y para el mantenimiento de las especies. Parece obvio que el ADN del esperma y la integridad de la cromatina son esenciales para una transmisión efectiva de la información genética a las generaciones siguientes, y la acumulación de pruebas indica que la cromatina espermática anómala o el daño en el ADN puede influir en la fertilidad masculina. Sin embargo, en el caso de los humanos, al igual que ocurre en la mayoría de las especies, una cierta proporción del esperma eyaculado contiene espermatozoides con ADN fragmentado, con independencia de la eficacia biológica del organismo en cuestión. Ahora bien, cierto es que, en general, en los individuos con cierta tendencia a ser estériles, la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado suele ser mayor que en los fértiles. El estudio de la fragmentación del ADN en el esperma es un tema de gran interés actual y hay varias revisiones que recogen los frutos de una investigación muy activa en los campos de la andrología, la fertilidad, la reproducción y también en el campo de las ciencias básicas, dado que la estructura de la cromatina en el espermatozoide es todavía desconocida¹⁻⁶.

Sin embargo, y a pesar del interés que despierta lo que se relaciona con el espermatozoide, también es cierto que la calidad del ADN, con toda seguridad la esencia de esta célula, no se evalúa en los análisis rutinarios del esperma. Hecho que se sustenta, en parte, en la complejidad de las técnicas existentes para tales fines. Este tipo de obstáculos puede tener los días con-

tados dado que, en la actualidad, hay metodologías eficaces que cualquier laboratorio puede implementar sin requerimientos logísticos complejos o que demanden una aplicación tecnológica sofisticada. Éste, al que podríamos llamar “parón tecnológico” para tener una idea acertada de cuál es el estado de la fragmentación del ADN espermático, está presente desde que irrumpió la metodología desarrollada por Evenson (SCSA, *sperm chromatin structure assay*) hace ya casi 30 años. El interés que se generó para el análisis de este parámetro era obvio, pero desgraciadamente la tecnología no era accesible para la mayoría de los laboratorios; incluso la gran mayoría de los que se formaron después del nacimiento del SCSA apenas fueron capaces de asumirla. Esta situación ha generado toda suerte de desarrollos tecnológicos paralelos con los que se ha conseguido, todo hay que decirlo, resultados muy variopintos. Quizás sea ésta una de las razones por las que hay un bajo nivel de comprensión de la importancia de este parámetro en el momento de evaluar el papel del factor masculino en la fertilidad. De esta forma, la controversia que hay acerca de la relación entre la frecuencia de los espermatozoides con ADN fragmentado y fecundación, la calidad embrionaria tras la fecundación o el éxito o fracaso del embarazo, presiden las publicaciones científicas que aparecen día tras día.

Afortunadamente, el consenso entre las distintas formas de ver el problema apunta al hecho de que, dentro de cada especie, los individuos con mayores tasas de fragmentación en su ADN espermático no forman parte de la distribución normal de los valores observados en este parámetro y, además, suelen presentar más problemas en el momento de la fecundación. Sin embargo, la compleja relación entre las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas del posible daño en el ADN, así como el alcance y la fidelidad de las vías de reparación del ADN que tiene lugar en el oocito, una vez que el ADN del espermatozoide ha penetrado en él, podrían explicar también parte de la disparidad de los resultados observados. En cualquier caso, la influencia de una mala calidad del ADN espermático en la capacidad fecundante parece clara. En el caso contrario, situación científicamente asumible, se podría plantear como hipótesis que un espermatozoide con su ADN fragmentado puede fertilizar y generar individuos normales con la misma eficacia que uno que no lo tuviera... pero eso se tendría que demostrar científicamente.

Por otra parte, la evaluación de la fragmentación del ADN en el espermatozoide no debe considerarse como un parámetro de fecundidad independiente, sino integrado en el estudio seminal completo como un complemento de los parámetros de calidad del esperma que se evalúan de forma rutinaria y en el con-

texto del cuadro clínico que delimitamos de forma previa: cuadros de infertilidad no identificada, varicocele, infecciones, cáncer, obesidad, cuadros de estrés por acción de sustancias lesivas hacia el ADN, etc. En cualquiera de los casos, lo que sí que parece ser cierto es que a la evaluación de la calidad de ADN se tiende a exigirle más que a los demás parámetros de calidad seminal. El clínico desea tener un valor de corte exacto por encima o por debajo del cual pueda decidir si ese individuo es o no fértil. La pregunta es: ¿le exigimos lo mismo a otros parámetros, como la concentración, la motilidad o la morfología? La respuesta es sencilla, como parámetros aislados, no. Se hace una valoración integrada de toda la información que se puede derivar del estudio y, con todo ello, algunas veces se acierta y otras se falla. Probablemente, la situación no varíe en demasía si a la valoración global de un semen con los parámetros al uso, se le añade el estudio de la calidad del ADN. Pero puede ser que fallemos menos. Y de eso se trata. Por lo tanto, en nuestra modesta opinión, creemos necesario que el personal clínico, en colaboración activa con el investigador básico, sean capaces de identificar las preguntas que carecen de una respuesta clara en el tratamiento del problema de la fragmentación del ADN espermático y su importancia en la fertilidad. Sin duda, esto ayudará a obtener conclusiones que serán más o menos acertadas, pero que con toda seguridad reflejarán de manera honesta la importancia total o parcial que pueda tener el concurso de una molécula de ADN de mala calidad en la fertilización.

Este trabajo, a diferencia de otras revisiones trata de presentar un visión acerca de los aspectos científicos y técnicos en términos de preguntas frecuentes (FAQ) que todo estudioso de este tema tan apasionante se ha hecho alguna vez o se hace cada día, dado que algunas de estas FAQ siguen todavía sin tener una respuesta clara. En el compendio de preguntas elegidas se ha incluido algunas que pueden tener interés en la práctica clínica de rutina. La intención del escrito es identificar los campos abiertos de interés en formato de preguntas, intentar mostrar de forma simplificada hechos asentados y afinar posibles interpretaciones que se generan en el momento de intentar entender el denso entresijo de la fragmentación del ADN espermático.

¿CUÁLES SON LOS MECANISMOS QUE PROVOCAN FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO?

Las bases que definen la fragmentación de ADN en células espermáticas maduras no se conocen con el detalle que se requiere. Los mecanismos que producen el daño están en parte identificados, pero la procedencia

del daño, una vez que éste se localiza en el espermatozoide maduro, no se puede identificar con facilidad. Se han propuesto 3 hipótesis principales que explicarían la presencia de ADN fragmentado en el espermatozoide.

– En la primera hipótesis se relaciona la presencia de roturas en la cadena del ADN en células maduras con el intercambio del complejo de histonas por el de protaminas que ocurre en el proceso de la espermiogénesis. Este intercambio, dirigido a conseguir una mayor compactación de la molécula de ADN, genera cierto nivel de estrés en la torsión de la molécula de ADN, dado que hay un superenrollamiento heredado de la presencia de histonas. Para eliminar este tipo de tensiones y facilitar el reemplazo de las histonas por protaminas se genera un cierto nivel de roturas en las moléculas de ADN que serán posteriormente reparadas. Este tipo de daño y reparación, netamente estructural, se ha demostrado en espermátidas en estado de elongación de ratones y posiblemente también ocurra de forma similar en el caso de los humanos. Con bastante probabilidad el proceso está presidido por la topoisomerasa II^{7,8}. En consonancia con la presencia de este tipo de daño estructural, se ha demostrado en las espermátidas en estado de elongación, ahora de un insecto, la presencia de configuraciones de ADN-triplex cuya localización varía a lo largo del la espermátila según avanza la compactación de la cromatina. Estos dominios de ADN-triplex colocalizan con los sitios físicos en los que detectan roturas en la molécula de ADN⁹. La presencia de anomalías que impidan que todo el proceso concluya, podría dar lugar a una compactación incompleta de la cromatina durante el proceso de maduración, de tal forma que regiones con roturas no reparadas pueden persistir en las células del esperma maduro. De hecho, los ratones con delecciones específicas para los alelos Tnp1 o Tnp2 muestran un aumento en la frecuencia de espermatozoides con ADN dañado¹⁰⁻¹².

– La segunda hipótesis propone que la fragmentación del ADN es la consecuencia de un exceso de estrés oxidativo en el tracto reproductivo masculino. Los altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), podrán ser consecuencia de su liberación por los leucocitos activados y/o macrófagos, por ejemplo, frente a una respuesta inflamatoria generada ante un proceso infeccioso. La presencia de células inmaduras en el esperma y que mantienen cantidades excesivas de citoplasma, como por ejemplo la presencia de gotas citoplasmáticas proximales o distales¹³⁻¹⁷, pueden también contribuir a provocar altos valores de oxidación, en este caso de tipo endogénico. El estrés oxidativo puede desencadenarse cuando la producción de ROS supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal, incluyendo enzimas

como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, así como agentes que bloquean la cascada de reacciones redox¹⁶. Normalmente este tipo de daño suele generar daños en las bases y roturas en 1 de las 2 hebras de la doble cadena del ADN.

– La tercera hipótesis implica al proceso apoptótico. Con el concurso de enzimas nucleolíticas se generarían roturas de cadena doble en la molécula de ADN¹⁸⁻²⁰, de manera similar a lo que puede ocurrir en las células somáticas²¹. La presencia de las caspasas 8, 1 y 3 en la región postacrosomal y de la caspasa 9 en la pieza media se han relacionado con este tipo de procesos²². Por otra parte, en las células de esperma humano, ratón y hámster se ha encontrado una nucleasa endógena que pudiera mediar en el proceso²³. Adicionalmente, la presencia de células de esperma maduro con marcadores de apoptosis, como Fas, Bcl-x, p53, o anexina-V, especialmente en algunos varones infértilles, podría explicarse por haber escapado de la acción de un proceso apoptótico abortivo¹⁸. Sin embargo, la situación no es tan clara como en principio se podría asumir, dado que no hay correlación entre la presencia de estos marcadores típicos de apoptosis y el grado de fragmentación del ADN en algunos individuos²⁴. Por otra parte, no hay una metodología eficaz que nos permita inducir la activación de la caspasa en espermatozoides humanos²⁵. Esto sugiere que el proceso de fragmentación del ADN, si es por apoptosis, podría ser impulsado por un mecanismo ligeramente diferente al que opera en otros tipos celulares. Hecho que no debería sorprendernos dado que se ha encontrado vías de fragmentación del ADN y muerte celular no dependientes de caspasa²⁶.

Finalmente, debemos tener en cuenta que la presencia de ADN fragmentado en un espermatozoide maduro puede ser el resultado de diferentes procesos combinados, dado que los mecanismos propuestos en las 3 hipótesis no son excluyentes y lo más probable es que no operan como fenómenos aislados. Por ejemplo, se podría asumir que el proceso apoptótico y el daño generado por ROS puedan estar asociados, y lo mismo podría ocurrir tras un proceso de espermiogénesis anormal con acumulación de roturas, hecho que podría ser detectado por el proceso de señalización de la apoptosis.

¿SE RELACIONA LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO CON DETERMINADOS CUADROS CLÍNICOS?

El hecho de que la mayor parte de la investigación respecto a la fragmentación del ADN haya emergido de grupos relacionados con la reproducción asistida da

como resultado que el debate se haya centrado excesivamente en entender la relación entre la fragmentación del ADN y el embarazo. Sin embargo, la integridad del ADN del esperma tiene también un innegable valor en la evaluación de la calidad del esperma en determinadas patologías andrológicas, como el varicocele, el cáncer o determinadas infecciones bacterianas. En este sentido, el espermatozoide, al ser una célula muy sensible a los cambios en la homeostasis del sistema que lo genera, puede ofrecer información valiosa acerca de la gravedad de determinadas enfermedades, de la eficacia terapéutica y puede servir como un marcador de toxicología genética^{27,28}. Por ejemplo, la utilización del test de dispersión de la cromatina permite categorizar ciertos niveles de daño en las muestras de esperma en pacientes que presentan varicocele²⁹. En concreto, en estos pacientes se detectó una proporción mucho más alta de células espermáticas con unos valores de daño superiores a los controles y con un nivel de afectación en una de las subpoblaciones de mayor rigor y en mayor frecuencia que en los controles. Sería de interés ampliar este estudio con nuevos pacientes y comprobar si esta particularidad es exclusiva para los pacientes con varicocele, como parece indicar este estudio. Si se confirma, este test podría ser una prueba rápida y no invasiva tanto para el diagnóstico como para su seguimiento, tanto si se procede con cirugía como si no.

Otro caso interesante son los pacientes oncológicos. Principalmente los afectados por linfomas, seminomas y otros tipos de cáncer testicular. Parece ser que en estos casos, la frecuencia de espermatozoides con un elevado valor de fragmentación puede ser la norma³⁰. Esto sugiere que el proceso oncológico, por se, puede afectar a la calidad del esperma y a la fragmentación del ADN. En estos casos, la decisión de la congelación de muestras seminales, si se procede con tratamientos de radio o quimioterapia, debiera incluir un análisis de los valores de fragmentación como medida informativa hacia el paciente.

En un estudio reciente de muestras procedentes de pacientes con infección genitourinaria producida por *Chlamydia trachomatis* y *Micoplasma*, se ha observado un aumento significativo en la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado en individuos afectados por este tipo de infección. En estos casos, los parámetros seminales estándar no se vieron afectados y mantuvieron valores que se consideran normales tras un análisis rutinario. Además, el tratamiento con antibióticos consiguió una disminución parcial de los valores de fragmentación, lo que también informa de la eficacia del tratamiento³¹.

Los cuadros de diabetes parece ser que también cursan con daños colaterales que se manifiestan en incrementos en los índices de fragmentación en el esperma-

tozoide, según se presentó en el congreso de la European Society of Human Reproduction and Embryology en 2008. El Dr. Mallidis y sus colaboradores demuestran que la diabetes tiene una influencia adversa en la fertilidad, y este efecto lo relacionan con las poblaciones de ARN espermático. Resulta notablemente interesante que muchos de los cambios están asociados a transcritos relacionados con enzimas de reparación. De tal forma que este tipo de pacientes podría tener serios problemas para reparar su ADN, y las roturas que se generan como parte normal del proceso de compactación de la cromatina no se repararían.

Los episodios posvacunación también pueden tener repercusiones directas en la calidad del ADN. En ovejas, se ha podido comprobar que tras una vacunación masiva con miloxan, una vacuna polivalente, los valores de fragmentación se elevaban hasta casi un 90% transcurridos 20 días. Y esto ocurría en individuos con valores bajas no superiores a un 10% en los estudios rutinarios³².

Por último, el fondo genético de los individuos debiera considerarse como un factor que puede predisponer al individuo a autogenerar más daño en sus espermatozoides. Por ejemplo, en ratones *knockout* para actividad telomerasa, el tamaño de las secuencias teloméricas se reduce de modo crítico tras varias generaciones. Esto resulta en una inestabilidad genómica que da lugar a un incremento de los valores de degradación del ADN espermático³³.

Es decir, con independencia del papel que pueda jugar los valores de fragmentación de muestras de esperma para asociarlo al problema de la esterilidad, su caracterización causal nos puede ayudar a entender y así poder paliar efectos colaterales que otros cuadros clínicos desencadenan en células como los espermatozoides que, en principio, no tienen porque verse afectadas de una forma directa. En concreto, en el caso de las infecciones por *Chlamydia*, infección notablemente asintomática, puede generar unos grados de infertilidad críptica notables. El conocimiento de los efectos en este tipo de casos, evidentemente nos ayuda a conseguir un tratamiento específico en el varón para la corrección del problema. Así pues, el tratamiento debe ser pertinente en la pareja, dado que la corrección de la posible infección en la mujer no evitaría un posible problema de infertilidad de la pareja de no corregirse de forma paralela en el varón.

¿QUÉ FACTORES EXTERNOS INCREMENTAN LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO?

Hay múltiples estudios que sugieren que la calidad del semen humano y la capacidad de fertilización han disminuido durante las últimas décadas^{34,35}. El detri-

mento acelerado de la calidad seminal se ha relacionado con el deterioro, también acelerado, del medio ambiente en el que se desenvuelve la sociedad moderna. Inevitablemente, se está pagando un precio por generar unos elevados niveles de contaminación, por denostar los cambios en los estilos de vida tradicionales, por las exposiciones puntuales a sustancias tóxicas o bien por relajar una dieta basada en principios naturales y “entendibles” por el organismo en pro de la comida industrial^{36,37}. La presión que se ejerce sobre la calidad seminal, con toda seguridad, se incrementa con la capacidad que adquiere el ser humano de transformar, de forma eficiente, las materias primas y derivados durante la revolución industrial.

En lo que se refiere a los efectos de la polución, diversos estudios muestran que la calidad seminal global se ve notablemente afectada por los efectos a una exposición continua de estos factores. De esta forma, la motilidad y la concentración presentan un decremento notable por la polución³⁸. De igual manera, y de acuerdo con los estándares de control de calidad fijados en Estados Unidos, se comprobó que superados los límites aceptados para determinados compuestos en la atmósfera, el porcentaje de ADN fragmentado en algunos individuos analizados era mayor que en individuos menos expuestos. Es interesante señalar que algunos individuos eran capaces de mantener unos niveles normales de producción de esperma³⁹. Parece ser que algunas combinaciones alélicas, como las relacionadas con GSTM1 (genes relacionados con glutatión-transferasa) conferirían a los individuos portadores la capacidad de metabolizar los productos tóxicos con una mayor efectividad y paliar los efectos directos de las sustancias tóxicas⁴⁰.

La obesidad es otro de los problemas inherentes a los modos de vida desarrollados por la sociedad moderna. En este caso, el efecto que un elevado índice en la masa corporal tiene en la calidad del ADN espermático es evidente. Se estima que un sobrepeso de 25 kg eleva notablemente la cantidad de espermatozoides con ADN fragmentado⁴¹. Con esto, las pruebas de medida de los valores de fragmentación serían muy recomendables en situaciones de infertilidad en las que el varón tenga un sobrepeso.

El tabaco es otro de los efectores de daño celular que también pudiera tener efectos en la calidad seminal. En este caso, la evidencia de un daño sobre el espermatozoide, en términos de un aumento en el daño registrado en el ADN, no es tan directa aunque no se debe descartar y puede afectar a los procesos de capacitación espermática²⁸.

La edad se podría considerar como un factor externo que cada individuo internaliza inexorablemente. El dicho “que la edad no perdona” parece ser que tie-

ne su respaldo cuando se analiza la calidad seminal en términos de fragmentación del ADN. Wyrobek et al⁴² y Smith et al⁴³ demostraron que había un aumento claro en los valores de fragmentación del ADN espermático en relación con la edad. Estos mismos autores comprobaron que en un grupo de varones de edad media de 46,4 años, con un rango de variación que oscilaba entre los 22 y los 80 años, se detectaba un incremento notable en el daño del ADN, que en este caso se podría atribuir a roturas de cadena sencilla, dado que estos espermatozoides son mucho más sensibles a la acción de soluciones alcalinas. Es interesante resaltar que estos mismos autores relatan que el efecto del consumo elevado de cafeína también aumenta el daño en el ADN del espermatozoide, pero en este caso generando roturas de doble cadena, susceptibles de ser trasformadas en alteraciones cromosómicas.

¿CUÁLES SON LAS LESIONES QUE SE ESPERAN EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE?

El origen de la fragmentación del ADN en los espermatozoides se relaciona, en algunos casos, con actividades enzimáticas, por acción de nucleasas, ya sean endógenas o exógenas. Estas enzimas pueden producir roturas en el ADN, bien en una sola cadena (SSB, *single stranded breakage*) y/o en ambas cadenas del ADN (DSB, *double stranded breakage*). La topoisomerasa II, una de las enzimas que participan en la remodelación de la cromatina espermática, podría generar DSB en la molécula de ADN en el proceso de liberación de histonas y un correcto reemplazo por protaminas⁴⁴. Evidentemente, las enzimas que participan en el proceso apoptótico y que generan DSB, también deberían considerarse como efectores endógenos de daño en el ADN. Alternativamente, determinados reactivos con capacidad oxidativa (ROS) y otras moléculas, como los derivados del óxido nítrico, parecen generar principalmente SSB y daños en las bases^{45,46}. La base nitrogenada típica generada por ROS es la 8-oxoguanina (8-oxoG), que se suele denominar como marcadora del daño oxidativo⁴⁷.

Si bien está por demostrar de forma experimental, tal vez las lesiones más peligrosas sean las DSB. En las células somáticas, son las principales responsables de la producción de alteraciones cromosómicas tipo inversiones, traslocaciones, cromosomas dicéntricos y formación de micronúcleos, y parece ser que este tipo de anomalías disparan el proceso apoptótico⁴⁸. En general, no se espera que las DSB estén producidas directamente por ROS, a menos de que hubiera una producción extrema muy localizada dentro del

misma espermatozoide y muy cercana a un área concreta del núcleo. Sin embargo, las ROS podrían producir DSB a través de una activación de las nucleasas⁴⁹. Algunos trabajos han especulado acerca de la posibilidad de que las DSB corresponderían a daño de tipo “primario” mientras que las lesiones en las bases producidas por el estrés oxidativo corresponderían a daño “secundario”⁵⁰. Esta distinción no tiene mucho sentido desde el punto de vista de la mutagénesis, dado que las lesiones en el ADN simplemente ocurren o no ocurren. ¿Por qué el daño en las bases no es “primario”? ¿por qué esa distinción? Por lo tanto, este tipo de especulación, lejos de ayudar a entender la realidad de los acontecimientos, genera más confusión.

¿ES CORRECTA LA DISTINCIÓN ENTRE ROTURAS “REALES” FRENTE A ROTURAS “POTENCIALES” DEL ADN?

Algunos autores han propuesto diferencias en la eficacia de los distintos tests al uso para medir la fragmentación del ADN. De esta forma, se argumenta que los tests basados en la incorporación de nucleótidos en las roturas utilizando reacciones enzimáticas, como por ejemplo la acción de la transferasa terminal, medirían roturas “reales” del ADN, mientras que las técnicas basadas en la desnaturalización de la molécula de ADN a partir de roturas existentes, detectarían roturas “potenciales” del ADN^{50,51}. Se argumenta que las primeras serían mejores predictoras de embarazo que las últimas. Además, se especula sobre la idea de que el daño producido en una cadena de ADN no generaría problemas para formar el pronúcleo, dado que tras la fertilización, el ADN no se desnaturizaría dentro del oocito debido a que se encuentra inmerso en un ambiente donde el pH es neutro.

Es necesario aclarar varias cosas: *a)* nunca ha habido la distinción entre lesiones “reales” y roturas “potenciales” del ADN, en el campo de la mutagénesis, las lesiones son o no son; *b)* la incubación con una solución ácida, como parte del proceso que se utiliza en las técnicas de medida del daño basadas en la desnaturalización parcial del ADN, no genera nuevas roturas ni lugares susceptibles de que se produzcan roturas; *c)* los 2 sistemas para medir el daño, tanto el enzimático como el desnaturizante, detectan “roturas reales”, entendiendo por “roturas reales” las que están presentes en la cadena de ADN con independencia de su origen. De hecho, son estas modificaciones en la cadena las que confieren al ADN tanto la susceptibilidad de ser diana para añadir nuevos nucleótidos por

determinadas polimerasas, caso de la *in situ nick translation* (ISNT) o la transferasa terminal en el caso del TUNEL, como la susceptibilidad de potenciar la desnaturalización, la cual empieza a partir de los extremos de la rotura⁵². El único concepto en el campo de la mutagénesis que podría asimilarse a la idea de “lugares potenciales de daño” son regiones del ADN reconocidas como lugares lábiles alcalinos (LLA)⁵³. Estos motivos de ADN se corresponden a lugares apurínicos o apirimidínicos, o a daños generados en la desoxirribosa. Son daños muy concretos. Este tipo de situaciones hace que un tratamiento alcalino pueda transformar estas lesiones en roturas de ADN de cadena sencilla. Esta situación no ocurre si el ADN se somete a un tratamiento ácido. De hecho, el ADN de esperma humano es muy sensible a la desnaturalización alcalina, mucho más que los niveles de sensibilidad que ofrecen otros tipos celulares somáticos⁵⁴⁻⁵⁶. La presencia de una proporción elevada de LLA en los espermatozoides parece ser una característica transespecífica que se relaciona con una estructura peculiar, normal, de su cromatina.

El posible efecto de las roturas del ADN sobre la formación del pronúcleo no se deriva de la desnaturalización del ADN dentro de la célula, sino del bloqueo de la progresión a través del ciclo celular y/o de la muerte celular tras el reconocimiento, señalización y procesamiento del daño presente en el ADN. Posiblemente hay cierta confusión con la mayor o menor severidad del daño de acuerdo con su naturaleza: la presencia de DSB es casi sinónimo de letalidad mientras que las SSB se asumen como daño menos severo. Sin embargo, ni las técnicas enzimáticas ni las basadas en la desnaturalización, discriminan ambos tipos de roturas.

Finalmente, numerosos estudios han encontrado siempre una buena correlación entre los resultados de las diferentes técnicas de estudio del daño en el ADN de los espermatozoides^{21,57,58}.

Llegados a este punto, la siguiente pregunta que se genera se relaciona directamente con los aspectos técnicos que, muchas veces por no entendidos en su esencia, provocan toda suerte de equívocos o malos entendidos que en nada ayudan a comprender mejor el problema al que nos enfrentamos. En un capítulo editorial recientemente publicado en la *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana* (volumen 25, 2008) uno de los autores de este artículo decía: “Bajo mi experiencia, cualquier técnica es perfecta para analizar el daño en el ADN si somos capaces de controlarla y somos juiciosos con lo que estamos haciendo”. Bajo ese paraguas, intentemos dar una respuesta lógica a la siguiente pregunta.

¿QUÉ METODOLOGÍA ES MÁS EFECTIVA PARA MEDIR EL DAÑO EN ADN EN EL ESPERMATOZOIDE?

Hay diversas técnicas para detectar la fragmentación del ADN en una muestra seminal, y las estrategias que se utilizan para obtener una apreciación del daño residente son muy distintas.

Un grupo de técnicas basa su eficacia en la adición enzimática de nucleótidos modificados para ser incorporados en los lugares afectados de la cadena de ADN. Entre ellas están enzimas como la transferasa terminal, capaz de añadir un nucleótido modificado utilizando los extremos 3' OH libres que se generan tras la presencia de una rotura (TUNEL). La ISNT, una posible alternativa al TUNEL, que utiliza la polimerasa I (Pol I) procedente de *Escherichia coli* para incorporar nucleótidos marcados utilizando los extremos que contienen roturas en el ADN^{21,59}. Una variante posible sería utilizar el fragmento Klenow, un producto activo generado tras la proteólisis controlada de la Pol I de *E. coli*.

En otro grupo de técnicas se encuentra una de las primeras, y quizás la más popular en estos momentos, el SCSA. Este proceso se basa en la susceptibilidad que presentan los extremos rotos del ADN, tanto sean SSB o DSB, a producir ADN de cadena sencilla utilizando como punto de partida las roturas. La desnaturación se realiza de forma controlada enfrentando el ADN a una solución ácida. Este proceso sólo desnaturiza de forma parcial el ADN fragmentado y deja intacta la molécula que mantenga una configuración de ADN en doble cadena. Posteriormente, se utiliza un colorante con características metacromáticas, como el naranja de acridina, para la tinción. Este colorante tiene la capacidad de emitir fluorescencia en el rojo anaranjado al interaccionar con ADN de cadena sencilla (el procedente de la desnaturación controlada), mientras que la emisión es en verde cuando el ADN permanece intacto. La discriminación entre ambas emisiones se realiza con citometría de flujo.

Una variante de esta metodología adaptada a la microscopía óptica, tanto de campo claro como de fluorescencia, es el test de dispersión de la cromatina (SCD, *sperm chromatin dispersion*; con su variante en formato de kit Halosperm®). Este proceso se diseñó para que determinados laboratorios, que no tenían acceso a la citometría de flujo o eran remisos a utilizar técnicas de ámbito más molecular como el TUNEL o la ISNT, pudieran realizar de forma sencilla y en su propio laboratorio un análisis de la fragmentación del ADN de forma rápida y eficaz. El método se basa, en esencia, en generar desnaturali-

zación controlada del ADN y, posteriormente, una desproteinización⁶⁰⁻⁶². El proceso global requiere 3 pasos críticos: *a*) integración de la muestra en un material inerte de azarosa, microgel, sobre un portaobjetos; *b*) desnaturación ácida del ADN en los núcleos de espermatozoides con ADN fragmentado, y *c*) tratamiento con una solución de lisis para eliminar proteínas nucleares. Con ello, y tras la tinción de rigor para microscopía de campo claro o para fluorescencia, se generan unos halos de dispersión de la cromatina donde los espermatozoides que no muestran halos visibles se identifican con valores altos de fragmentación del ADN, mientras que los que presentan halos de dispersión consistentes se consideran normales. Estos resultados se ven respaldados con otro tipo de metodologías como el SCSA, el TUNEL, el ensayo cometa y el DBD-FISH (*DNA breakage detection-FISH*)^{58,61-64}.

Finalmente, y en otro apartado de técnicas eficaces para detectar el daño, está el ensayo cometa, también conocido por electroforesis en células individualizadas. La esencia de este modelo experimental consiste en movilizar dentro de un campo electroforético fragmentos de ADN procedentes de nucleoides generados por un proceso de desproteinización. La idea general es que los fragmentos resultantes de la rotura de la molécula de ADN (DSB) se desplazan con mayor intensidad en el campo electroforético. Esto generaría diferencias entre los núcleos que contienen ADN fragmentado y los que no lo tienen; diferencias que se contemplan bajo el microscopio como una imagen de un "cometa" formado por una cabeza y una cola de cromatina en la dirección del ánodo que es de mayor tamaño a medida que el nivel de fragmentación es mayor. La cantidad y la distancia de migración del ADN que se recoge en la cola del cometa representa de alguna forma el daño registrado^{65,66}. Hay programas informáticos que permiten un análisis detallado de estos aspectos. Adicionalmente, el ensayo cometa se puede realizar en un ambiente alcalino que ayuda a desnaturizar el ADN si el daño está presente como SSB^{54,56}. La utilización conjunta de ambos métodos es una estrategia perfecta para evaluar de forma simultánea el daño que afecte a cadena doble o a cadena sencilla⁶⁷.

El cometa es, quizás, la técnica que potencialmente puede generar mejor información acerca del daño en el espermatozoide. Tiene varias limitaciones importantes, es lenta en su aplicación, compleja, hay que conocerla con mucho detalle y requiere de personal especializado. Ahora bien, es muy eficaz para evaluar el daño en secuencias de ADN específicas combinada con FISH⁶⁸. Pero esta posibilidad la aleja más del campo de aplicación en clínica.

¿SE DEBE HABLAR DE METODOLOGÍAS DIRECTAS E INDIRECTAS PARA ANALIZAR EL DAÑO EN EL ESPERMATOZOIDE?

Dentro del estudio de la fragmentación del ADN se ha recurrido varias veces a comparar la efectividad de una técnica con respecto a lo que ofrece otra^{58,62,69}. Como resultado de estos estudios, y como hemos comentado anteriormente, surge la idea de la eficacia de la metodología dependiendo de si la técnica de detección del daño es directa o indirecta. De hecho, se sugiere que el TUNEL es una técnica más eficaz que otras debido a que ofrece un marcado directo del daño que se genera. En primer lugar habría que definir qué se entiende por detección directa del daño. Si por detección directa se entiende que una polimerasa o una transferasa tiene que ser capaz de localizar un extremo 3'OH en una cromatina altamente condensada para incorporar un nucleótido modificado (con una molécula trazadora fluorescente o con una molécula que modifique el nucleótido a incorporar del tipo digoxigenina o biotina, para luego ser detectada con una reacción antígeno-anticuerpo y más tarde ser visualizada en el microscopio), la detección directa resulta un tanto peculiar y probablemente tan directa como desnaturalizar un ADN roto y discriminar la cadena sencilla de la doble con un fluorocromo. Por otra parte, el TUNEL, al igual que todo tipo de técnicas, tiene sus problemas. Por ejemplo, Domínguez-Fandos et al⁶⁹ encontraron que las medidas de fragmentación en el esperma tras la utilización del TUNEL y medido con citometría de flujo o bajo el microscopio, ofrece resultados tan dispares que en uno de los casos –citometría de flujo– dobla los valores obtenidos en microscopia. Por otra parte, es sabido que las enzimas tienen una accesibilidad restringida al ADN como consecuencia de la compactación a la cromatina. De esta forma, el uso de isoesquizómeros –enzimas de restricción que reconocen la misma diana pero que tienen distinto origen– para digestión *in situ* de fibra de cromatina, produce unas pautas de corte del ADN distintas sobre la misma cromatina⁷⁰. Finalmente, la detección del daño utilizando incorporaciones forzadas por enzimas requiere nucleótidos con grupos hidroxilo libres en la posición 3' que se genera tras la rotura. Si bien los finales 3'-OH son los extremos que se generan tras la acción de las nucleasas, estos extremos 3' están modificados cuando son el resultado de la acción directa de un radical libre⁷¹. La pregunta ahora es saber si la ADN-polimerasa o la transferasa son capaces de incorporar nucleótidos con idéntica eficiencia en este tipo de extremos. Por último, hay que ser conscientes de un hecho: las técnicas de TUNEL se aplican utilizando kits comerciales. Es-

tos kits están diseñados específicamente para que las reacciones enzimáticas funcionen sobre ADN interactuando con histonas, no con protaminas, ya que el origen de estos kits reside en la necesidad de analizar el proceso apoptótico. Habrá que demostrar que la eficacia de incorporación de nucleótidos por medio del TUNEL frente a cromatina histónica, es idéntica que frente a cromatina protaminizada.

Probablemente, las valoraciones de los valores de fragmentación que se realizan en distintos laboratorios ofrecen variaciones sustanciales utilizando incluso la misma técnica. Todo el mundo tiene esa percepción de los datos de motilidad espermática y todavía no hemos sido capaces de homogenizarlo. Y es que, con toda probabilidad, la mejor técnica a utilizar, es la que mejor conocemos. Ésa será la única que nos da nuestro propio umbral y nivel de confianza para comparar los datos que nosotros generamos. Nuestro grupo ha utilizado un amplio abanico de técnicas para analizar el daño en el espermatozoide y la conclusión que hemos sacado se podría resumir en que el SCSA es la técnica que resulta más onerosa de poner a punto, requiere de personal especializado y no es sencillo su ajuste final. Es relativamente rápida en su ejecución, sobre todo si se articula con la filosofía de un servicio muy activo, dado que el calibrado de los láseres y el mantenimiento del citómetro, especialmente utilizando espermatozoides y coloración con naranja de acridina, no están exentos de cierta complejidad. El TUNEL es básicamente lento de proceso, y no es sencillo manejar muchas muestras a la vez. Es interesante adquirir los productos de la reacción por separado para abaratar costes. Esto nos permite modular las reacciones necesarias para el marcado del ADN. El SCD en su versión comercial Halosperm® y Halomax®, es económico, rápido y versátil, ya que se puede conjugar con detección simultánea de daño en el ADN y daño en proteínas, analizar daño y aneuploidías, variaciones en el nivel de daño, detección de daño en secuencias específicas, etc. El ensayo cometa es muy informativo dado que, en teoría, permite analizar el tipo de daño que se produce. Pero definitivamente no es un método que se pueda utilizar para el diagnóstico por ser lento, complejo y por requerir de personal altamente especializado.

¿QUÉ CONSECUENCIAS TIENEN LOS DISTINTOS TIPOS DE DAÑO EN LA FERTILIZACIÓN?

Las consecuencias del daño en el ADN del esperma en relación con el desarrollo normal del embrión es el resultado de una situación de equilibrio entre el daño que se registra en el ADN de los espermatozoides y la

capacidad de reparación de ese mismo daño en el oocito⁷². De hecho, el ADN de un espermatozoide normal contiene una proporción mayor de lesiones del ADN que las que se encuentran en ciertos núcleos somáticos como leucocitos⁵⁵. Esto se podría deber a la presunta falta de reparación en un genoma con una muy baja tasa de transcripción como lo es el espermatozoide. Sin embargo, el oocito debe reparar adecuadamente el daño que se transmite en el momento de la fertilización. De lo contrario, la presencia de ADN con “discontinuidades” en la doble cadena no sería una situación asumible por las divisiones mitóticas necesarias para el crecimiento embrionario. Además, el tipo y/o la complejidad de las lesiones en el ADN en los espermatozoides pueden variar, no sólo entre espermatozoides sino también entre distintos individuos. Tras la penetración en el oocito de un espermatozoide que contenga, por ejemplo, un ADN altamente afectado por miles de roturas de cadena doble (p. ej., como ocurre después de un proceso apoptótico) la situación que se genera en estado de pronúcleo supera, con mucho, la capacidad de reparación del oocito. En consecuencia, y en primer lugar, la cromatina espermática no podría reemplazar las protaminas por las histonas y proceder con la replicación normal del ADN. De poder realizar este proceso no es seguro que se mantenga la fidelidad de ordenación ortodoxa del genoma debido a la presencia de reordenamientos tras el proceso de reparación. Este tipo de situaciones afectaría al resultado global de la fertilización.

Si el daño en el espermatozoide presentara un bajo valor de roturas del ADN, que afectara a las 2 hebras o a 1 de ellas, las diversas vías de reparación del ADN de los oocitos podrían ser eficaces y reparar el daño residente en el pronúcleo masculino. Después de la replicación del ADN, algunos lugares no reparados podrían generar aberraciones cromosómicas⁷³. La presencia de roturas de cadena sencilla no reparadas puede dar lugar a roturas de doble cadena tras la replicación del ADN, con la generación posterior de anomalías cromosómicas estructurales^{48,74,75}. A su vez, los reordenamientos cromosómicos pueden conducir a altos niveles de inestabilidad que afecten a la correcta segregación mitótica de los cromosomas, lo que resultaría en muerte celular y pérdida embrionaria^{76,77}. Cuando la reparación del ADN es completa, tanto en la fidelidad de la copia como en el ordenamiento de las secuencias, los estadios de mórula y blastocisto se podrían alcanzar con facilidad, el genoma paterno se expresaría normalmente y el embarazo sería más probable. De lo contrario, si los procesos de reparación no son totalmente eficaces, puede ocurrir un aborto espontáneo. La extrema complejidad de todo

el proceso, consecuencia de los efectos de interacción entre la diversidad en la naturaleza del daño junto con la capacidad variable de reparación de cada oocito, podría explicar las correlaciones diferentes, obtenidas en distintos estudios, entre el daño detectado en el espermatozoide y la capacidad de fertilización. Los modelos animales, utilizando metodologías de fertilización *in vitro* (FIV) o bien con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), utilizando núcleos de espermatozoides en los que se pueda controlar los niveles de daño producido, serían de gran interés para entender lo que puede ocurrir en el caso de humanos.

¿ES ESENCIAL DISTINGUIR LA LOCALIZACIÓN DE LAS ROTURAS DEL ADN EN ÁREAS CODIFICANTES O NO CODIFICANTES?

El ADN en el genoma de un organismo contiene básicamente 2 tipos de secuencias: unas capaces de codificar y otras que no lo hacen. En muchas especies, tan sólo alrededor del 1,5% del genoma consiste en secuencias que tienen capacidad informativa plena (exones) y son capaces de codificar determinadas proteínas. La función del resto del genoma no está bien delimitada y se le atribuyen desde papeles estructurales, como las secuencias altamente repetidas, hasta controladores de la regulación de la expresión génica de forma directa o a través de sucesos o cambios epigenéticos^{78,79}. Dado que la mayor parte del genoma no es codificante, se ha afirmado que la mayoría de las roturas del ADN en el espermatozoide no serían peligrosas al no afectar regiones exónicas⁵⁰. De este modo, se podría explicar la obtención de embarazos con altos valores de fragmentación en los espermatozoides.

Recientemente, Zhang et al⁸⁰ sugieren que los valores elevados de SSB están directamente relacionados con un incremento en la fertilidad del individuo. De nuevo la contradicción entre 2 apreciaciones acerca de una misma idea preside la escena de la fragmentación. Con respecto a este punto en particular habría que enfatizar algunos aspectos: *a)* las DSB y otras lesiones, especialmente si son abundantes dentro del núcleo, desencadenan el bloqueo del ciclo celular o disparan la muerte por apoptosis; *b)* las lesiones que no se reparan o se reparan mal pueden dar lugar a anomalías cromosómicas que pueden llevar a la muerte celular en el primer ciclo o en los ciclos posteriores tras su inducción. Tanto el disparo de la apoptosis, como la mala reparación del daño producido, la presencia de las alteraciones cromosómicas y la muerte celular, tienen lugar independientemente

de la localización de las lesiones iniciales; es decir, que afecten a dominios del genoma con capacidad informativa o no.

¿HAY UN VALOR DE CORTE PARA CONSEGUIR EMBARAZO Y UN "EFECTO ICEBERG"?

Algunos estudios, especialmente utilizando la técnica SCSA, han sugerido que habría un umbral de frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado ($> 30\%$), por encima del cual la probabilidad de embarazo sería extremadamente baja¹. La fragmentación sería la punta del iceberg, indicando que el ADN de los demás espermatozoides tendría algún tipo de lesiones, posiblemente bases con daño de tipo oxidativo, especialmente de 8-oxoG^{51,81,82}. Esta hipótesis requiere varias precisiones: *a)* el ataque del ADN por ROS no sólo da lugar a lesiones en las bases sino también roturas de la cadena. Adicionalmente, este tipo de radicales son capaces de generar modificaciones en otros componentes del espermatozoide como las membranas, variando su fluidez, puede afectar a los grupos tiol de las proteínas, así como a determinadas vías de fosforilación y de formación de ATP⁸¹ y todo ello influye en el potencial de fertilización; *b)* podría haber un nivel de daño indetectable en los demás núcleos, pero si fuese así sería un nivel muy bajo, posiblemente reparable de forma eficaz por el oocito, a no ser que éste tuviera problemas en los sistemas de reparación, y *c)* se han descrito embarazos obtenidos con altos valores de fragmentación, y otros estudios, también empleando el SCSA, no han mostrado ningún umbral por debajo o por encima del cual se pueda generalizar la propuesta del 30%^{83,84}. Sin embargo, no se puede descartar que en ciertos grupos concretos de pacientes el efecto iceberg sea operativo. Así pues, es necesario profundizar en la investigación en este campo para obtener respuestas más precisas.

¿CUÁL ES EL LÍMITE ACEPTABLE PARA RELACIONAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN CON LA FERTILIDAD?

Esta es la pregunta crucial. Y como tal, la respuesta no es sencilla a pesar de la gran cantidad de datos obtenidos al respecto. Como se ha señalado en la pregunta anterior, Evenson et al, en diferentes estudios que reseñan a lo largo de este trabajo, señalan que unos valores de fragmentación superiores a un 30% implicarían que el individuo prácticamente no sería fértil. Por otra parte, en determinados estudios^{84,85}, parece ser que esta situación no es tan crítica, e individuos con valores superiores a los propuestos por

Evenson et al pueden dejar descendencia normal. Curiosamente, Evenson y Wixon⁸⁶, en un reciente metaanálisis elevan la horquilla que se relaciona con la infertilidad a un 30-40%. Casi con toda seguridad las 2 situaciones son comprensibles y tienen su parte de razón. Por una parte, presentar valores de fragmentación superiores a un 20% podría ser un indicativo de que algo anormal ocurre. Los índices de fragmentación en individuos jóvenes, normozoospérmicos y con fertilidad probada suelen presentar índices de fragmentación por debajo del 15-20% y rara vez por debajo de un 5%. De hecho Erenpreiss et al⁸⁷ sugieren la repetición de medidas de los índices de fragmentación dentro de un individuo cuando los valores de fragmentación superan el 20% en alguna de las medidas. De este tipo de resultados se desprende que, como tendencia general, individuos con índices menores a un 15% serían normales, los que muestran un valor de afectación media ($> 15\%$ y $< 30\%$) pueden estar revelando algún tipo de problema, pero son potencialmente fértiles, mientras que los individuos que presentan valores $> 30\%$ son potencialmente estériles. Pero habría que perder esa tendencia hacia la rigidez en la interpretación de estos márgenes, que sólo consideran el factor masculino, y estar preparados para entender que pueden haber individuos con valores de fragmentación superiores a un 30% y ser fértiles, igual que puede haber individuos que presenten valores inferiores a un 15% y no serlo. Es decir, habría que considerar a la fragmentación del ADN como un parámetro más dentro del análisis de la calidad seminal y cuya correcta interpretación en conjunción con otros datos de calidad seminal nos ayudará, con toda seguridad, a entender mejor la esterilidad asociada a cada uno de los pacientes.

¿RESPALDA LA CLÍNICA LAS HIPÓTESIS PLANTEADAS ACERCA DE LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN Y FERTILIDAD?

Uno de los estudios más extensos realizados hasta la fecha para intentar correlacionar la fertilidad y la fragmentación del ADN, corresponde a una prospección multicéntrica que incluyó 622 parejas⁸⁵. En este estudio se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en otros anteriores⁸⁸ en los que la fertilidad global y la tasa de fragmentación no mostraban una correlación tan elevada como la mostrada en otros estudios⁸⁶. Sin embargo, sí que se encuentra una correlación entre la frecuencia de las células de esperma con fragmentación del ADN y la tasa de fertilización del oocito, la calidad del embrión, el tipo de blastocisto y la tasa de implantación. Sin embargo, la relación con la tasa

de embarazo no era tan evidente. Esto parece bastante obvio dado que, en cierta forma, se están sometiendo a una tasa de selección muy alta y sólo los embriones de mejor calidad morfológica y de mejor desarrollo in vitro y con mejor pronóstico, son los que se utilizan tras FIV o ICSI. Debido a la correlación observada entre la fragmentación del ADN, el rendimiento y la calidad del embrión, los embriones posiblemente fertilizados por el esperma que presentaran el ADN fragmentado no serían seleccionados para la transferencia. Posiblemente, existe la influencia de la fragmentación del ADN de esperma en el embarazo y sería desenmascarada si los embriones se transferieran de forma no selectiva. Hecho que va en contra del propio concepto de la reproducción asistida.

Teniendo en cuenta estos resultados, se sugirió que la evaluación de la fragmentación del ADN puede ser de interés para los pacientes con baja tasa de gestación del embrión, baja calidad embrionaria y también sería un criterio útil a utilizar en el momento de generar los embriones que se pretende transferir. En cualquier caso, parece posible que determinados subgrupos de pacientes podrían beneficiarse significativamente de una evaluación global del esperma en la que se incluya la integridad del ADN. Esto se ha sugerido recientemente como una de las conclusiones obtenidas en un metaanálisis, donde la integridad del ADN del esperma y los resultados de las pruebas de embarazo en FIV y los ciclos de ICSI, muestran una correlación estadísticamente aceptable⁸⁹. En cualquier caso, muchos estudios han establecido correlaciones con diferentes criterios de valoración de la fecundidad (es decir, la fecundación de oocitos, el desarrollo del embrión, la calidad morfológica del embrión, la implantación, el embarazo, el aborto). El hecho sorprendente es que las correlaciones son diversas en los diferentes estudios, incluso utilizando las mismas pruebas, evidenciando la complejidad de todo el proceso. En los animales en los que se utiliza la reproducción asistida a gran escala y, probablemente, debido al hecho que hay una fuerte selección sobre los reproductores, las correlaciones entre un alto valor de fragmentación del ADN del esperma y la fertilidad están claramente establecidas⁹⁰.

¿ES CLÍNICAMENTE ACEPTABLE CONSIDERAR LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN COMO UN VALOR ÚNICO Y ESTÁTICO?

Es bien conocido en el mundo de la andrología que la calidad de una muestra espermática se deteriora con el tiempo tras la eyaculación. Así, parámetros críticos en la fertilidad como la motilidad decrecen con rapi-

dez si no se utilizan diluyentes y estrategias de conservación óptimas. Estrategias que varían entre especies. Curiosamente, en contados trabajos se hace referencia a la posible pérdida de la calidad del ADN espermático con el tiempo tras la eyaculación. Si esta fuera estable, a lo largo de lo que nosotros consideramos vida útil de una muestra seminal para ser utilizada en reproducción asistida, no habría ningún problema. Pero la situación es muy distinta y se ha comprobado que el tiempo es un factor que se debe considerar en el momento de evaluar los valores de fragmentación de una muestra espermática⁹¹⁻⁹³. Por otra parte, con independencia del período que transcurra entre la eyaculación y el análisis de la muestra, no hay que olvidar que, excepto en la ICSI, el espermatozoide utiliza, adicionalmente, un tiempo hasta que es capaz de llegar al oocito, bien cuando se realiza una inseminación vía intrauterina o bien en condiciones de FIV. Esta situación añade un nuevo elemento de "ruido" que podría explicar en parte algunas de las discrepancias entre los resultados que muestran distintos laboratorios cuando analizan la fragmentación del ADN. En prácticamente el 99% de las publicaciones que hemos consultado, ningún laboratorio hace referencia explícita al tiempo transcurrido entre la toma de la muestra, la medida de la fragmentación y, mucho menos, se referencia ese valor en el momento de la inseminación. Cierto es que algunos autores han llamado la atención sobre este particular⁹⁴.

El proceso de degradación del ADN espermático se visualiza mejor si se emulan las condiciones de manejo y utilización del esperma. El espermatozoide, al ser eyaculado presenta un descenso en su temperatura biológicamente correcta por los medios de recogida y procesamiento de la muestra. La temperatura biológicamente correcta –en torno a 37 °C– tan sólo se recupera tras los procesos de inseminación posteriores. Si se analiza qué es lo que ocurre con los valores de fragmentación transcurrido ese período de incubación en muestras de donantes criopreservadas, se encontrará que ciertos individuos son capaces de duplicar su tasa basal de fragmentación en menos de 2 h, con un incremento de la degradación del ADN estimada en un 8% por hora y que en la mayoría de los casos, transcurridas 24 h, las tasas de fragmentación superan el 80%⁹³. Desde un punto de vista biológico, esto indica que cuando la muestra de semen se utiliza para FIV, el valor de fragmentación de ADN de los espermatozoides inoculados o coincubados con el ovocito puede ser mayor en el momento de la fecundación que el observado en la determinación previa. En la rutina de FIV, los oocitos son expuestos a los espermatozoides durante la noche y con un máximo de exposición de unas 20 h. En algunos casos, este largo

período de coincubación se ha demostrado que produce problemas en el desarrollo normal del embrión y, de hecho, hay estudios que aconsejan tiempos cortos de coincubación para lograr buenas tasas de fertilización⁹⁵.

Es interesante resaltar que la dinámica de fragmentación del ADN del esperma, en términos de velocidad, varía entre especies y entre los individuos de cada especie^{91,93,96-98}. Basándonos en este hecho, creemos que puede tener mucho interés realizar un estudio programado de dinámica de la fragmentación a cada uno de los pacientes semanas antes de la inseminación. Este tipo de información nos ofrece una idea clara de la velocidad de degradación que presenta este individuo y decidir si optamos por una FIV o por una ICSI. Este tipo de estudios es interesante en los bancos de donantes, dado que la congelación no varía el valor basal de fragmentación de la muestra que se procesa pero sí que acelera la velocidad de degradación tras descongelación, y ésta es mucho más acentuada en unos donantes que en otros⁹³.

En términos de dinámica, se puede comprobar que la viabilidad espermática, estudiada como pérdida de la calidad de membranas, decrece a medida que la fragmentación aumenta^{92,99,100}. Sin embargo, es interesante resaltar que no hay correlación entre ambos parámetros cuando se realiza un estudio dinámico en el tiempo. Por lo tanto, ¿es la dinámica diferencial de la fragmentación de ADN del esperma entre los individuos un factor que debe tenerse en cuenta en el momento de la práctica reproductiva? Esta pregunta queda en *stand-by* en este momento y se requiere de mucha más información para obtener una respuesta directa. Pero así y todo, este aspecto específico de daño en el ADN merece más atención por 2 razones principales: *a)* el valor real de fragmentación del ADN del esperma cuando éste ha penetrado la membrana celular del oocito podría ser más elevado que el estimado después de la eyaculación o la descongelación, y *b)* la comparación de los resultados de diferentes laboratorios, o incluso los obtenidos en el mismo laboratorio, puede estar sesgada si no se hace referencia clara a los tiempos transcurridos entre la eyaculación o la descongelación, el análisis de la muestra y, por supuesto, a los valores obtenidos momentos antes de iniciar el proceso de fertilización.

¿HAY UN TRATAMIENTO QUE DISMINUYA LOS VALORES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO?

Hay casos donde se puede reconocer una asociación causal con un incremento de la fragmentación del ADN del espermatozoide, por ejemplo, en la infec-

ción genitourinaria por *Chlamydia*³¹. Tal como se ha referido, el tratamiento antibiótico parece ser efectivo en la reducción de los valores de fragmentación. También podría ocurrir tras algunas operaciones de varicocelectomía. Pero en general, no teniendo claro cuáles son las causas del daño que somos capaces de registrar en el ADN de los espermatozoides, es difícil que podamos poner un remedio directo al problema. No obstante, y debido a que el daño de tipo oxidativo es uno de los factores que parece desempeñar un papel importante, diferentes grupos de trabajo se han esforzado en comprobar si determinadas dietas, ricas o empobrecidas, en factores que se conocen juegan un papel decisivo en el proceso de formación de los espermatozoides, pueden actuar como paliativos o aceleradores del daño. De esta forma, factores presentes en la dieta como vitaminas A, C, E, carnitina, folato, cinc o selenio, parece que juegan un papel en la fertilidad¹⁰¹⁻¹⁰⁴. En general, una baja ingesta de nutrientes con propiedades antioxidantes ejerce un efecto negativo en la calidad del semen^{105,106}. De hecho, algunos autores proponen que una dieta rica en vitaminas C y E y betacarotenos, mejora la capacidad reproductiva de los varones a través de una reducción del efecto negativo que genera el daño oxidativo^{107,108}. Sin embargo, como siempre, este tipo de afirmaciones tiene su parte contraria, y en algunos casos las sustancias con capacidad antioxidante y que teóricamente podrían proteger del daño al ADN no fueron tan efectivas ni en condiciones *in vitro* ni *in vivo*^{109,110}.

Como siempre, alcanzar conclusiones finales y definitivas acerca de un problema de alta complejidad no es tan elemental como se llega a desprender de una serie de estudios puntuales. Y, en este caso, lo obvio sería diseñar cócteles de sustancias que ayudaran a paliar este efecto. Pues bien, incluso bajo estas premisas la situación no es baladí. Por ejemplo, el uso combinado de acetil-cisteína o ascorbato y alfa-tocoferol podrían generar un incremento en el daño del ADN en el espermatozoide^{111,112}. Alternativamente, determinados compuestos estrogénicos pueden inducir un tipo de ROS cuyos efectos podrían ser paliados por los flavonoides¹¹³. Por lo tanto, el diseño de tratamientos antioxidantes clínicamente eficaces dependerá, también y en gran medida, tanto de la combinación de los elementos, como de la fuente de estrés oxidativo y del tipo de daño que se origine.

Algunos tratamientos de antioxidantes por vía oral podrían reducir el porcentaje de espermatozoides dañados y mejorar los resultados de la ICSI en pacientes con elevados valores de fragmentación en el esperma¹¹⁴. Sin embargo, una asociación del tipo dosis-respuesta entre este tipo de factores no resulta tan

evidente. Como medida casi lógica y que pudiera ser paliativa de los efectos negativos de un incremento en la actividad de los ROS, habría que proponer una ingesta rica en carbohidratos, fibra, vitaminas A, C, E y folatos de origen natural, en detrimento, especialmente, de cierto tipo de grasas y proteínas en exceso. Es decir, todo lo que resulta tan difícil de llevar a cabo en el modelo social que convenimos en llamar desarrollado.

EPÍLOGO

La fecundidad es un fenómeno multifactorial que implica, por lo general, el concurso de ambos miembros de la pareja y, con toda seguridad, el concurso de los 2 tipos de gametos procedentes de ambos sexos. Hoy por hoy, la clonación, desde un punto de vista biológico, no se considera como un suceso reproductivo. Por lo tanto, las preguntas que hemos formulado bajo el prisma del varón serían también aplicables al caso de la mujer. Mientras que en el caso del varón la accesibilidad a muestras biológicas es relativamente sencilla, la situación es muy diferente en el caso de las mujeres. Esto implica que el nivel de desconocimiento del papel que pueda jugar la calidad de ADN en el sexo homogamético es mucho menor, por no decir prácticamente inexistente. Hecho que no exonera al oocito de poder verse afectado por procesos de apoptosis o de estrés oxidativo antes de la fertilización. Es interesante hacer esta reflexión para entender, en su justa dimensión, que la evaluación de la integridad del ADN del esperma es una pieza más que forma parte de un complejo rompecabezas que hay que ensamblar para entender la relevancia que éste pueda tener en la consecución de una fusión perfecta entre 2 núcleos haploides y que genere suficiente estabilidad genómica para forjar un individuo adulto normal. Las pruebas que evalúan la calidad del esperma no sólo deben informarnos de la capacidad de los espermatozoides para llegar al óvulo, sino también de su capacidad de fertilizar el ovocito y activar el crecimiento del embrión¹¹⁵. Parafraseando a Makhoul y Niederberger⁵¹, en el estudio de la eficacia de la fertilización por parte del factor masculino, habría que manejar información no sólo de la eficacia del “transportista” en el momento de realizar un desplazamiento de la mercancía, sino también tendríamos que ser eficaces en conocer la “calidad de lo que se transporta”. Adicionalmente, y esto es futuro en estos momentos, deberíamos conocer cuál es el aporte de la parte femenina en 2 niveles: *a)* daño que se genere en el ADN de su núcleo germlinal, y *b)* conocer la capacidad de reparación del daño por parte del citoplasma del oocito. En este sen-

tido nosotros somos partidarios de que se considere a la fragmentación del ADN del esperma como un parámetro adicional para el análisis de la calidad del esperma, dado que atribuirle un protagonismo absoluto sobre la capacidad/incapacidad de fertilización genera unas expectativas que no son congruentes con la complejidad de todo el proceso necesario para conseguir un embarazo a término. Por otra parte, la determinación de los valores de fragmentación puede proporcionar información beneficiosa en determinados cuadros de patología andrológica y debiera ser un complemento al análisis rutinario de otros parámetros seminales bien establecidos. Dentro de la medicina moderna, la fragmentación del ADN espermático debería evaluar, de forma simultánea dentro del contexto clínico de cada paciente o pareja. La dinámica variable del proceso de degradación del ADN observada en cada varón es una prueba irrefutable de que éste es el camino que hay que seguir.

Después de haber leído algunas de las FAQ sobre la fragmentación en el ADN del esperma podemos formular otra vez la pregunta: *¿qué espermatozoide piensa usted que tendrá más éxito reproductivo: uno que tenga el ADN íntegro o uno que tenga su ADN fragmentado?* En este caso, la respuesta directa del profano “pues... el espermatozoide que tiene su ADN íntegro”, quizás no fuera tan clara. Y hasta él llegaría a entender que si la evolución ha blindado la información genética contenida en un espermatozoide, rescatar toda la verdad que en él subyace, no es tarea sencilla. Pero esa circunstancia nunca nos debe sumir en el desaliento, ni en el rechazo ante lo no entendido. Todo lo contrario, como profesionales eficaces, que lo somos, deberemos identificar los problemas con nitidez y plantear las preguntas que consideremos más efectivas para dar una respuesta dentro de la lógica de la ciencia. Con ello disiparemos, al menos, parte de nuestras dudas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros colaboradores y técnicos por su labor en el momento de generar muchos de los datos que han contribuido a dar forma a este trabajo. La financiación se la agradecemos al MEC por los proyectos BFU 2007-66340/BFI y CGL2005-02898/BOS.

Bibliografía

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

2. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9:331-5.
3. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 2006;15:979-91.
4. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:715-21.
5. Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:384-95.
6. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5:36.
7. McPherson SMG, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermiogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Develop*. 1992;31:268-79.
8. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*. 2004;70:910-8.
9. Cerná A, López-Fernández C, Fernández JL, Moreno Díaz de la Espina S, de la Torre C, Gosálvez J. Triplex configuration in the nick-free DNAs that constitute the chromosomal scaffolds in grasshopper spermatids. *Chromosoma*. 2008; 117:15-24.
10. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*. 2001;28:82-6.
11. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod*. 2003;69:211-17.
12. Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003;111:483-8.
13. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998;59:1037-46.
14. Gil-Guzmán EG, Ollero M, López MC, Sharma RK, Álvarez JG, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001;16:1922-30.
15. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2002;78:1215-24.
16. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-43.
17. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:641-50.
18. 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.
19. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:428-32.
20. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000;21:903-12.
21. 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; 207:202-5.
22. Paesch U, Grunewald S, Agarwal A, Glander HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2004; 81:802-9.
23. Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*. 2005; 26:272-80.
24. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton JE, Mascha MA, Abdel-Hafez AJ, Thomas, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004; 19:129-38.
25. Grunewald S, Paesch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*. 2005;83:1106-12.
26. Candé C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ*. 2004;11:591-5.
27. Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxic Appl Pharmacol*. 2005;207: 532-7.
28. Viloria T, Garrido N, Fernández Remohí J, Pellicer A, Mesequer M. Sperm selection by swim-up in terms of DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion (SCD) test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril*. 2007; 88:523-5.
29. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. *J Androl*. 2006;27:106-11.
30. Mesequer M, Santiso R, Garrido N, Fernández JL. The effect of cancer on sperm DNA fragmentation measured by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. *Fertil Steril*. 2008; 90:225-7.
31. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril*. 2008;90:328-34.
32. Gosálvez J, Vázquez JM, Enciso M, Fernández JL, Gosálvez A, Bradley JR, et al. Sperm DNA fragmentation in Rams vaccinated with miloxan. *The Open Vet Scien J*. 2008;2:7-10.
33. Rodríguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosálvez J, Fernández JL. Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 2005;84:843-5.
34. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *BMJ*. 1992;305:609-13.
35. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 1997;105:1228-32.
36. Swan SH. Does our environment affect our fertility? Some examples to help reframe the question. *Semin Reprod Med*. 2006;24:142-6.
37. Tielemans E, Burdorf A, Te Velde ER, Weber RF, Van Kooij RJ, Veulemans H, et al. Occupationally related exposures and reduced semen quality: a case-control study. *Fertil Steril*. 1999;71:690-6.
38. Sherry G, Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*. 2000;108:887-94.
39. Rubes J, Selevan SG, Evenson P, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod*. 2005;20: 2776-83.
40. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res*. 2007;625:20-8.
41. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*. 2006;27:450-2.
42. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnhem N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *PNAS*. 2006;103:9601-6.
43. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*. 2007;22: 180-7.
44. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod*. 2005; 73:289-96.

45. Burney S, Caulfield JL, Niles C, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mut Res*. 1999;424:37-49.

46. Reiter TA. Chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Report*. 2006;11:194-206.

47. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med*. 1999;26:202-26.

48. Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2001;2:196-206.

49. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8576-85.

50. Alvarez JG. The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Hum Reprod*. 2005;20:2365-7.

51. Makhlof AA, Niederberger C. DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *J Androl*. 2006;27:316-23.

52. Rydberg B. The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat Res*. 1975;61:274-87.

53. Téoule R. Radiation-induced DNA damage and repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987;51:573-89.

54. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res*. 1989;184:461-70.

55. Muriel L, Segrelles E, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Structure of human sperm DNA and background damage, analyzed by *in situ* enzymatic treatment and digital image analysis. *Mol Hum Reprod*. 2004;10:203-9.

56. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Alkali-labile sites in sperm cells from Sus and Ovis species. *J Int J Androl*. 2008;31:354-63.

57. 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;236:231-7.

58. Chohan KR, Griffi JT, Lafromboise M, de Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006;27:53-9.

59. 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.

60. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes V, Ramírez-Díaz J, de la Torre J, et al. DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mut Res*. 2000;453:77-82.

61. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez J. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24:59-66.

62. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril*. 2005;84:833-42.

63. Gosálvez J, Fernández JL, Goyanes V, López-Fernández C. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Bio- tech*. 2006;1:38-51.

64. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp*. 2007;31:120-31.

65. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206-21.

66. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol*. 2007. En prensa.

67. Rivero MT, Vázquez-Gundín F, Muriel L, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Patterns of DNA migration in two-dimensional single-cell gel electrophoresis analyzed by DNA breakage detection-fluorescence *in situ* hybridization. *Environ Mol Mutagen*. 2003;42:223-7.

68. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Genescá A, Gosálvez J, Goyanes V. DBD-fish on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells. *Exp Cell Res*. 2001;270:102-9.

69. Domínguez-Fandos D, Camejo I, Ballesca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: Correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry*. 2007;71:1011-8.

70. Gosálvez J, López-Fernández C, Ferrucci L, Mezzanotte R. DNA base sequence is not the only factor for restriction endonuclease activity on metaphase chromosomes: evidence using isoschizomers. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;50:142-4.

71. Liu PK, Cui J, Moore N, Huang D. The *in situ* detection of apurinic/apyrimidinic sites and DNA breaks bearing extension blocking termini. *Methods Mol Biol*. 2002;203:235-44.

72. Menezo Y, Russo G, Tosti E. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24:513-20.

73. Genescá A, Caballín MR, Miró R, Benet J, Germa JR, Egoscue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet*. 1992;82:181-6.

74. Khanna KK, Jackson SP. DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27:247-54.

75. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jepesen P, et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mut Res*. 2002;25:17-36.

76. Carrano AV, Heddle JA. The fate of chromosome aberrations. *J Theor Biol*. 1973;38:289-04.

77. Evans HJ. Effects of ionising radiation on mammalian chromosomes. En: German J, editor. *Chromosomes and Cancer*. New York: Wiley & Sons, Inc.; 1974.

78. Shapiro JA. A 21st century view of evolution: genome system architecture, repetitive DNA, and natural genetic engineering. *Gene*. 2004;345:91-100.

79. Allegretti C, Thurston A, Lucas E, Young L. Epigenetics and the germline. *Reproduction*. 2005;129:137-49.

80. Zhang X, San Gabriel M, Libman J, Phillips S, Courchesne A, Zini A. Localization of single-stranded DNA in human sperm nuclei. *Fertil Steril*. 2007;88:1335-8.

81. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*. 1997;157:140-3.

82. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004;25:5-18.

83. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*. 2004;19:1409-17.

84. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 2005;84:356-64.

85. Vélez de la Calle JP, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jiménez C, Wittemer C, et al. Sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test in ART programmes: results of a large prospective multicentre study. *Fertil Steril*. 2008. En prensa.

86. 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. En prensa.

87. Erenpreiss JM, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod*. 2006;21:2061-4.

88. Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2006;85:371-83.

89. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with *in vitro* fertilization? *Fertil Steril*. 2008;89:823-31.

90. Rybar R, Faldikova L, Faldyna M, Machatova M, Rubes J. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Vet Med*. 2004;49:1-8.

91. Gosálvez J, Fernández JL, Gosálbez A, Arrollo F, Agarwal A, López-Fernández C. The dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil Steril.* 2007;88:S365.

92. López-Fernández C, Fernández JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram Theriogenology.* 2008;70:898-908.

93. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, Núñez R, Fernández JL, Caballero P, López-Fernández C, et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril.* 2008. En prensa.

94. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril.* 2004;82:1443-5.

95. Bungum M, Bungum L, Humaidan P. A prospective study, using sibling oocytes, examining the effect of 30 seconds versus 90 minutes gamete co-incubation in IVF. *Hum Reprod.* 2006;21:518-23.

96. Pérez-Llano B, Enciso M, García-Casado P, Sala R, Gosálvez J. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology.* 2006;66:2137-43.

97. 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.

98. Gosálvez J, Núñez R, Caballero P, Fernández JL, Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C. Fragmentación del ADN espermático ¿un concepto dinámico o estático? *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana.* 2008; 25:195-206.

99. Cortés-Gutiérrez, EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosálvez J. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology.* 2008;69:1022-32.

100. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Núñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril.* 2008. En prensa.

101. Wong WY, Thomas CM, Merkus JMWM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Male factor subfertility: possible causes and impact of nutritional factors. *Fertil Steril.* 2000; 73:435-42.

102. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2002;77:491-8.

103. Comhaire FH, Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile men. *Reprod Biomed Online.* 2003;7:385-91.

104. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2004;8:376-84.

105. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Sloter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 2005;20:1006-12.

106. Lewis V, Kochman L, Herko R, Brewer E, Andolina G, Song G. Dietary antioxidants and sperm quality in infertile men. *Fertil Steril.* 2006;86:S364.

107. Willett WC, Sampson L, Stampfer MJ, Rosner B, Bain C, Witschi J, et al. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol.* 1985; 122:51-65.

108. Vioque J, González L. Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results). *Eur J Cancer Prev.* 1991;1:19-20.

109. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl.* 2003;49:83-94.

110. Akmal M, Qadri JQ, Al-Waili NS, Thangal S, Haq A, Saloom KY. Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *J Med Food.* 2006;9:440-2.

111. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril.* 2000;73:459-64.

112. Ebisch IM, Pierik FH, de Jong FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl.* 2006;29:339-45.

113. Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod.* 2008. En prensa.

114. 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.

115. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril.* 2005;84:850-3.