

## ANÀLISI DE LA FRAGMENTACIÓ D'ADN ESPERMÀTIC I DEL POTENCIAL OXIDANT-REDUCTOR SEMINAL EN PACIENTS INFÈRTILS

Sergio Garcia-Segura<sup>1</sup>, Maria Oliver-Bonet<sup>1</sup>, Sandra Lara-Cerrillo<sup>2</sup>, Jordi Ribas-Maynou<sup>1</sup>, Ana Belen Castel<sup>3</sup>, Agustí Garcia-Peiró<sup>2</sup>, Jordi Benet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

<sup>2</sup> CIMAB, Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona, 08192 Sant Quirze del Vallès, Barcelona.

<sup>3</sup> Unitat de Reproducció, Servei de Obstetrícia i Ginecologia, Hospital Universitari Sos Espases, Palma, Illes Balears. Sergio.Garcia.Segura@uab.cat, Jordi.Benet@uab.cat

### Resum

L'avaluació de la fragmentació d'ADN espermàtic (SDF) és una estratègia diagnòstica d'infertilitat masculina considerada actualment com de les més prometedores per la seva relació amb diversos indicadors de salut reproductiva. L'assaig Comet és la tècnica experimental que presenta més sensibilitat i especificitat per detectar la SDF i permet, amb una simple variació del pH dels reactius, valorar tant el dany de cadena simple com el de cadena doble. L'estrès oxidatiu seminal, una de les causes d'infertilitat, està directament relacionat amb la SDF de cadena simple. Recentment, s'ha desenvolupat el sistema MiOXSYS que permet valorar els agents oxidants i antioxidants presents en la mostra seminal i s'ha proposat com una eina diagnòstica eficaç. Aquest sistema calcula de forma directa el potencial oxidant-reductor estàtic (sORP) a partir de mostres seminals líquides. L'objectiu d'aquest estudi és analitzar la relació entre la SDF i el sORP per valorar el seu potencial en el diagnòstic de les causes de la infertilitat. El test de correlació de Spearman revela que les variables SDF i sORP no presenten cap relació significativa ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) en cap dels dos tipus de dany, de cadena simple i de cadena doble. Els resultats obtinguts suggereixen que l'anàlisi de l'estrès oxidatiu seminal no reflexa l'estat d'integritat de l'ADN dels espermatozoides ejaculats però sí pot explicar la gran variabilitat interindividual que presenta la dinàmica de SDF observada al llarg del temps transcorregut post-ejaculació.

**Paraules clau:** infertilitat masculina, fragmentació d'ADN espermàtic, estrès oxidatiu, assaig Comet, MiOXSYS, ORP.

### Abstract

The evaluation of sperm DNA fragmentation (SDF) is a diagnostic strategy of male infertility, currently considered as the most promising for its relationship with various reproductive health indicators. Comet assay is the experimental technique that has a greater sensitivity and specificity to detect SDF and allows to assess both simple and double strand damage by changing the reagents' pH. Seminal oxidative stress, one of the causes of male infertility, has been directly related to simple strand SDF. Recently, the MiOXSYS platform has been developed to evaluate seminal oxidants and antioxidant agents in seminal samples and has been proposed as an effective diagnostic tool. This system directly calculates the static oxidation-reduction potential (sORP) from seminal samples after liquefaction. The aim of this study is to analyse the relationship between SDF and sORP to assess its potential in the diagnosis of infertility causes. Spearman's correlation test reveals that SDF and sORP variables do not show any significant relationship ( $p$ -value  $< 0.05$ ) in either of the two types of damage, simple and double strand damage. The results obtained suggest that seminal oxidative stress analysis does not reflect the state of DNA integrity of the ejaculated spermatozoa, but it can explain the high interindividual variability observed in the SDF dynamics over time post-ejaculation.

**Key words:** male infertility, sperm DNA fragmentation, oxidative stress, Comet assay, MiOXSYS, ORP.

### INTRODUCCIÓ

La infertilitat masculina humana és una malaltia multifactorial que està implicada en aproximadament el 50% dels casos de parelles infèrtiles (De-Kretser, 1997; Agarwal

*et al.*, 2015). L'eina més utilitzada per valorar les causes de la infertilitat masculina és el seminograma, però el seu valor diagnòstic és limitat (Lewis, 2007). Per aquest motiu, la recerca s'ha centrat en trobar nous paràmetres que permetin optimitzar els resultats. Una de les aproxi-

macions més prometedores és l'estudi de la fragmentació del ADN espermàtic (SDF), que s'ha relacionat inversament amb diversos indicadors de salut reproductiva com la taxa de fecundació, la d'implantació o la d'avortaments espontanis de repetició (Zini *et al.*, 2008; Lewis and Simon, 2010; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a, 2012b). Existeixen diferents metodologies que permeten l'anàlisi de la SDF com poden ser l'assaig *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end Labeling* (TUNEL), el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) o el *Sperm Chromatin Dispersion test* (SCD), però la tècnica que presenta una major sensibilitat i especificitat és l'assaig Comet (Ribas-Maynou *et al.*, 2013; Javed *et al.*, 2019). Aquest assaig es basa en la descompactació del nucli espermàtic i una posterior electroforesi en cèl·lula única per fer migrar els fragments trencats cap al pol positiu, generant així una cua semblant a la d'un cometa. Així mateix, és l'únic mètode que permet una mesura quantitativa del dany de l'ADN de forma individual per a cada cèl·lula (Lewis and Simon, 2010) i l'únic que permet detectar de forma separada la incidència de trencaments de cadena simple i de cadena doble, segons es realitzi la tècnica en condicions de pH alcalí o de pH neutre, respectivament (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

Un altre paràmetre important per al diagnòstic de la infertilitat masculina és l'estrès oxidatiu seminal. Un correcte balanç redox és essencial per a que diferents processos fisiològics, com la compactació de la cromatina, la capacitat, la hiperactivació o la reacció acrosòmica, es produeixin de forma adequada (Agarwal *et al.*, 2017). L'increment dels nivells d'espècies reactives d'oxigen (ROS) es troba directament relacionat amb alguns paràmetres seminals i cel·lulars, com la motilitat espermàtica, la peroxidació lipídica o la SDF i es considera una de les principals causes de la patogènesi de la infertilitat masculina (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2017). L'estrès oxidatiu pot produir-se per agents endògens o exògens; la causa coneguda més freqüent és el varicocele, tot i que una disminució de la activitat antioxidant també hi pot estar relacionada (Kefer *et al.*, 2009; Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013; Santana *et al.*, 2017). S'ha descrit que els homes infèrtils presenten majors concentracions de ROS (De-Lamirande and Gagnon, 1995) i menors concentracions d'antioxidants en el plasma seminal (Sharma *et al.*, 1999; Roychoudhury *et al.*, 2016). Habitualment, els estudis de l'estrès oxidatiu es basen en la mesura dels nivells de ROS però recentment s'ha desenvolupat una nova metodologia, el sistema MiOXSYS, que permet calcular el potencial oxidant-reductor (ORP), una mesura de la relació entre agents oxidants i antioxidants, per obtenir una visió més acurada del balanç redox seminal (Agarwal *et al.*, 2016) i

que s'ha proposat com a una eina diagnòstica eficaç. Per valorar la ORP l'aparell calcula el potencial oxidant-reductor estàtic (sORP) que és l'índex més informatiu (Agarwal *et al.*, 2017). En estudis anteriors, el nostre grup de recerca va relacionar de forma directa els nivells de ROS seminal i la SDF de cadena simple (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a). L'objectiu d'aquest estudi és analitzar la relació entre la SDF i el sORP per valorar el seu potencial per al diagnòstic de les causes d'infertilitat.

## MATERIALS I MÈTODES

### *Obtenció de les mostres espermàtiques*

Les mostres seminals s'han obtingut de pacients infèrtils normozoospermics sense factor femení conegut i de pacients idiopàtics provinents del Instituto de Fertilidad de Palma de Mallorca en col·laboració amb Genosalut, centres que addicionalment han realitzat el seminograma de les mostres. S'han recollit un total de 35 mostres, amb un mínim de 2 dies d'abstinència sexual, que es congelen immediatament després de la ejaculació i són transportades a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), on s'han emmagatzemat en nitrogen líquid a -195.8°C fins al seu anàlisi. Tots els donants van signar el consentiment informat i l'estudi va ser aprovat pel corresponent comitè ètic.

### *Anàlisi de la fragmentació de l'ADN espermàtic*

Totes les mostres han estat avaluades mitjançant l'assaig Comet tant en condicions alcalines com neutres d'acord a la metodologia descrita pel nostre grup de recerca (Ribas-Maynou *et al.*, 2013). Les mostres han estat analitzades al Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona (CIMAB) i valorades per un únic investigador en un microscopi de fluorescència per reduir la variabilitat intra-observadors. Els resultats es mostren indicant el percentatge d'espermatozoides amb SDF de cada mostra.

### *Anàlisi del balanç d'oxidants i antioxidants seminals*

L'anàlisi de l'estrès oxidatiu segons els nivells d'antioxidants al plasma seminal s'ha mesurat mitjançant el sistema MiOXSYS, un aparell electrònic que permet llegir el voltatge del flux d'electrons resultant de les reaccions redox de la mostra seminal gràcies a un sensor galvanostàtic. Es transfereixen 30 µL de la mostra líquida a aquest sensor i el resultat, mesurat en milivolts (mV), correspon al sORP de la mostra. Un valor elevat de sORP indicaria una major presència de agents oxi-

dants que d'antioxidants. Totes les mesures han estat preses per duplicat, utilitzant finalment la mitjana aritmètica per a l'anàlisi estadística.

#### Anàlisi estadística

Per a realitzar el tractament estadístic de les dades s'ha utilitzat el programa informàtic SPSS Statistics v22.0 (Statistic Package for Social Science, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). S'ha utilitzat el test de Shapiro-Wilk per a l'estudi de normalitat de les dades i el coeficient de correlació de Spearman per a l'estudi de correlació entre les variables. Per a tots els test estadístics es va considerar un nivell de significació de 0,05.

### RESULTATS

#### Anàlisi descriptiva dels paràmetres seminals

L'anàlisi de les mostres mitjançant l'assaig Comet ha posat de manifest que els individus presenten un percentatge d'espermatozoides amb SDF de cadena simple del 31,5% [10 – 76] de mediana i un percentatge d'espermatozoides amb SDF de cadena doble del 70% [27 – 90] de mediana. Respecte al sORP, les mostres presenten un balanç oxidant-reductor de 56,85 mV [1,5 – 131,3] de mediana.

#### Correlació de la fragmentació d'ADN espermàtic i el potencial oxidant-reductor seminal

El coeficient de correlació de Spearman per a mostres no paramètriques revela que la SDF de cadena simple i el sORP no presenten cap relació significativa entre ells (Taula 1). Tal i com es pot veure en el gràfic de punts (Figura 1), les dades mostren una gran dispersió sense correlació significativa.

Paral·lelament, entre la SDF de cadena doble i el sORP tampoc s'observa cap relació significativa, ni en el coeficient de Spearman (Taula 1) ni en el gràfic de dispersió, que mostra també una gran dispersió de les dades (Figura 2).

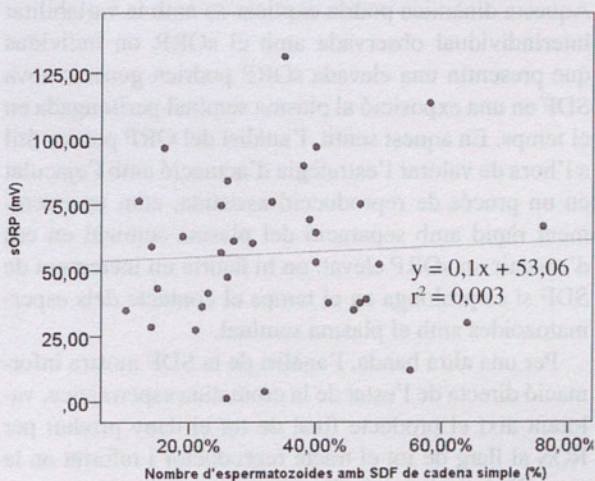
**Taula 1.** Coeficient de correlació de Spearman entre la variable sORP i les variables percentatge d'espermatozoides amb SDF de cadena simple i de cadena doble.

	$\rho$	p-valor
SDF de cadena simple	0,053	0,760
SDF de cadena doble	-0,169	0,332

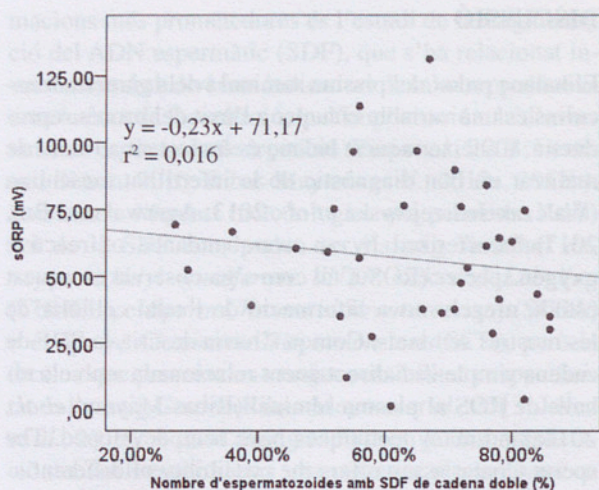
### DISCUSSIÓ

El balanç redox del plasma seminal i dels gàmetes masculins és una variable clau per a l'èxit del procés reproductiu. Conèixer aquest balanç és important a l'hora de realitzar un bon diagnòstic de la infertilitat masculina (Walczak-Jedrzejska *et al.*, 2013; Agarwal and Bui, 2017) characterized by an overabundance of reactive oxygen species (ROS i, tal com s'ha observat en aquest estudi, afegeix nova informació de l'estat cel·lular de les mostres seminals. Com ja s'havia descrit, la SDF de cadena simple està directament relacionada amb els nivells de ROS al plasma seminal (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a) and many techniques have been developed. The sperm Comet assay offers the possibility of differentiating single- and double-stranded DNA (ssDNA and dsDNA). En aquest estudi, però, no s'observa correlació de la SDF de cadena simple i de cadena doble amb el sORP. Aquest valor és una mesura integrada de la presència d'agents oxidants i reductors en el plasma seminal que manifesta una gran variabilitat interindividual (Figures 1 i 2).

En la figura 1 s'observa que mostres de semen que presenten valors alts de SDF tant poden presentar valors alts o baixos del sORP. Això es pot explicar pel fet que possiblement la major part de la fragmentació que presenten els espermatozoides d'un ejaculat s'ha produït prèviament en epidídim i vas deferent, on hi ha una font important de ROS que produeix SDF (Steele *et al.*, 1999; Sakkas and Alvarez, 2010) i no tant en el plasma seminal. Així, la presència d'un alt nivell d'agents oxidants al plasma seminal pot quedar compensat per un nivell alt d'agents antioxidants que redueixen el ORP i



**Figura 1.** Gràfic de dispersió entre els valors del paràmetre sORP (mV) i el percentatge d'espermatozoides amb SDF de cadena simple. S'ha calculat l'equació de la recta de regressió lineal i el seu coeficient de determinació.



**Figura 2.** Gràfic de dispersió entre els valors del paràmetre sORP (mV) i el percentatge d'espermatozoides amb SDF de cadena doble. S'ha calculat l'equació de la recta de regressió lineal i el seu coeficient de determinació.

la generació de nova SDF, però presentar una alta SDF prèvia. De la mateixa manera, un nivell baix d'agents oxidants i una reduïda presència d'agents antioxidants al plasma seminal farien augmentar lleugerament el ORP però sense un increment important de nova SDF.

Es conegut que la dinàmica de la fragmentació al llarg del temps post-ejaculat és molt variable tant en individus control com en pacients infèrtils o portadors de reorganitzacions cromosòmiques. S'ha descrit que independentment dels valors basals de fragmentació, les velocitats de fragmentació són molt diferents en tots aquests grups estudiats (García-Peiró *et al.*, 2011). Aquesta dinàmica podria explicar-se amb la variabilitat interindividual observada amb el sORP, on individus que presentin una elevada sORP podrien generar nova SDF en una exposició al plasma seminal perllongada en el temps. En aquest sentit, l'anàlisi del ORP pot ser útil a l'hora de valorar l'estratègia d'actuació amb l'ejaculat en un procés de reproducció assistida, com un tractament ràpid amb separació del plasma seminal en cas d'obtenir un sORP elevat, on hi hauria un increment de SDF si es prolonga en el temps el contacte dels espermatozoides amb el plasma seminal.

Per una altra banda, l'anàlisi de la SDF mostra informació directa de l'estat de la cromatina espermàtica, valorant així el producte final de tot el dany produït per ROS al llarg de tot el tracte reproductor i inferint en la taxa d'èxit reproductiu d'aquesta mostra, que pot ser optimitzada, per exemple, amb tractaments antioxidants.

El coneixement conjunt dels dos valors, l'estat de SDF i el sORP, pot tenir una aplicació clínica rellevant per a triar l'estratègia més adequada d'obtenció i mani-

pulació d'aquestes mostres seminals en processos de reproducció assistida.

## AGRAÏMENTS

Aquest treball ha rebut suport econòmic de ISCIII i FEDER (projecte PI14-00119) i de la Generalitat de Catalunya (projecte 2014SGR-0903). S. Garcia és beneficiari de una beca PIF 2016 de la UAB.

## BIBLIOGRAFIA

- AGARWAL, A. [*et al.*] (2015). «A unique view on male infertility around the globe». *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 13, núm. 1, p. 37.
- AGARWAL, A. [*et al.*] (2016). «MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma». *Fertility and Sterility*, vol. 106, núm. 3, p. 566–573.e10.
- AGARWAL, A. [*et al.*] (2017). «Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility». *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 34, núm. 1, p. 48–57.
- AGARWAL, A. [*et al.*] (2017). «Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility». *Investigative and Clinical Urology*, vol. 58, núm. 6, p. 385.
- DE-KRETZER, D.M. (1997). «Male infertility». *Lancet*, vol. 349, núm. 9054, p. 787–790.
- DE-LAMIRANDE, E. [*et al.*] (1995). «Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects». *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10 Suppl 1, p. 15–21.
- GARCÍA-PEIRÓ, A. [*et al.*] (2011). «Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes». *International Journal of Andrology*, vol. 34, núm. 6pt2, p. e546–e553.
- JAVED, A. [*et al.*] (2019). «Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility». *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, vol. 46, núm. 1, p. 14–21.
- KEFER, J.C. [*et al.*] (2009). «Role of antioxidants in the treatment of male infertility». *International Journal of Urology*, vol. 16, núm. 5, p. 449–457.
- LEWIS, S.E.M. (2007). «Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?». *Reproduction*, vol. 134, núm. 1, p. 31–40.
- LEWIS, S.E.M. [*et al.*] (2010). «Clinical implications of sperm DNA damage». *Human fertility*, vol. 13, núm. 4, p. 201–207.

- RIBAS-MAYNOU, J. [et al.] (2012a). «Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups». *Human Reproduction*, vol. 27, núm. 3, p. 652–658.
- RIBAS-MAYNOU, J. [et al.] (2012b). «Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor». *PLoS ONE*, vol. 7, núm. 9, p. e44679.
- RIBAS-MAYNOU, J. [et al.] (2013). «Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay». *Andrology*, vol. 1, núm. 5, p. 715–722.
- ROYCHOUDHURY, S. [et al.] (2016). «Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 33, núm. 5, p. 627–635.
- SAKKAS, D. [et al.] (2010). «Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis». *Fertility and Sterility*, vol. 93, núm. 4, p. 1027–1036.
- SANTANA, V.P. [et al.] (2017). «Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 34, núm. 7, p. 839–847.
- SHARMA, R.K. [et al.] (1999). «The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility». *Human reproduction*, vol. 14, núm. 11, p. 2801–2807.
- STEELE, E.K. [et al.] (1999). «A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia». *Molecular human reproduction*, vol. 5, núm. 9, p. 831–835.
- WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R. [et al.] (2013). «The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility». *Central European journal of urology*, vol. 66, núm. 1, p. 60–67.
- ZINI, A. [et al.] (2008). «Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis». *Human reproduction*, vol. 23, núm. 12, p. 2663–2668.

