*Biologia de la reproducció*
*Vol. 17, p. 57-62 (2022)*

# ESTUDI CORRELATIU ENTRE TÈCNIQUES MOLECULARS PER A LA DETECCIÓ DE L'ESTRÉS OXIDATIU EN MOSTRES DE SEMEN DE PACIENTS INFÈRTILS

Marina Leiva[1], Judit Castillo[1], Alberto de la Iglesia[1], Raquel Ferreti[2], Juan Manuel Corral[2,3], Rafael Oliva[1,4*], Meritxell Jodar[1,4*]

[1]Grup de Biologia Molecular de la Reproducció i el Desenvolupament, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Unitat de Genètica, Departament de Biomedicina, Universitat de Barcelona. Casanova 143, 08036, Barcelona.
[2]Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia (ICGON) de l'Hospital Clínic de Barcelona. Rosselló, 161, 08036, Barcelona.
[3] Servei d'Urologia, Unitat d'Andrologia i Institut Clínic de Nefrologia i Urologia (ICNU) de l'Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, 08036, Barcelona.
[4]Servei de Bioquímica i Genètica Molecular. Centre de Diagnòstic Biomèdic. Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, 08036, Barcelona.
*Autors de correspondència: Meritxell Jodar (meritxell.jodar@ub.edu), Rafael Oliva (roliva@ub.edu).

---

*Resum*

A dia d'avui, la infertilitat masculina representa un problema creixent a nivell global. Tot i així, l'avaluació del pacient infèrtil es basa principalment en l'estudi macroscòpic i microscòpic de l'ejaculat, havent una falta de protocols establerts pel diagnòstic i pronòstic de tots els possibles casos. Estudis actuals han destacat que l'estrès oxidatiu (EO) al semen podria ser un factor clau per a aquesta afectació, tot i que es desconeix en detall quines de les tècniques disponibles serien les més òptimes per la seva valoració. En aquest treball hem dut a terme un estudi pilot amb l'objectiu de valorar si tècniques complementàries al seminograma que avaluen diferents paràmetres de EO poden ser útils per a l'estudi de la infertilitat masculina. D'aquesta manera, hem realitzat un anàlisi correlatiu entre cinc tècniques moleculars consistents en la determinació del potencial reducció-oxidació del semen, la detecció d'espècies reactives d'oxigen (EROS) intracel·lulars i l'avaluació de la fragmentació del DNA espermàtic. Els resultats recolzen la utilització del valor de la concentració espermàtica per a normalitzar la mesura del potencial redox del semen. A més, suggereixen que la tècnica MiOXSYS podria ser útil per a obtenir una idea del EO de les mostres, tot i que es requereix un anàlisi amb més mostres per a confirmar les correlacions trobades.

*Abstract*

Nowadays, male infertility represents a global growing health problem. There are no established protocols for the diagnosis and prognosis of all cases, as those are primarily based only on the macroscopic and microscopic study of ejaculate. Recent studies have highlighted semen oxidative stress (OS) as a key factor in male infertility, although it is still unknow what type of techniques would be optimal for its evaluation. In this work we carried out a pilot study with the aim of determining whether complementary techniques to the seminogram evaluating different OS parameters might be applied for the study of male infertility. Therefore, we conducted a correlative analysis of five molecular techniques analyzing the reduction-oxidation potential of the semen, of the amount of intracellular reactive oxygen species and the DNA fragmentation. Our results support the use of sperm concentration value to normalize the measurement of the redox potential of semen. In addition, results suggest that the MiOXSYS technique may be useful in order to obtain an idea of the EO of the samples, although further analysis with more samples is required to confirm the correlations found.

---

## INTRODUCCIÓ

Actualment, seguint les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'avaluació de la fertilitat masculina es basa principalment en la realització d'un seminograma. A més, no es disposa de tractaments regulats per la OMS que permetin la millora de la fertilitat en els homes a nivell clínic (World Health Organization, 2021). No obstant, la infertilitat és una afecció creixent amb causes diverses, a molts nivells i encara àmpliament desconegudes (Skakkebaek et al., 2019). Nombrosos estudis han detectat un detriment de la quantitat i concentració d'espermatozoides a nivell global durant les últimes dècades, evidenciant una possible causa ambiental (Levine et al., 2017; Sharma et al., 2013). Conèixer aquestes causes podria ajudar-nos en el disseny i optimització de tractaments a nivell clínic i a una millora de l'èxit de les tècniques de reproducció assistida.

Recentment s'ha destacat l'estrès oxidatiu (EO) com a un factor important en la infertilitat idiopàtica masculina, i es calcula que el 30-80% dels homes infèrtils presenten espècies reactives d'oxigen (EROS) al plasma seminal (Agarwal et al., 2019). La font principal d'EROS al semen són els mateixos espermatozoides i els leucòcits que hi puguin haver, resultat de l'activitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules (Henkel, 2011; Sharma et al., 2001). No obstant això, s'ha descrit que els leucòcits i les cèl·lules espermàtiques immadures o anòmales generen molta més quantitat d'aquestes molècules reactives (Gomez et al., 1996; Sharma et al., 2001), de manera que seria lògic esperar una correlació entre la concentració d'EROS intracel·lulars i alguns paràmetres seminals com la contaminació (correlació positiva) o les formes normals (correlació negativa).

L'EO pot interferir en la capacitació dels espermatozoides, al igual que alterar diverses de les seves estructures i components, com membranes, proteïnes i DNA, impossibilitant l'èxit de la fecundació i el desenvolupament embrionari (Aitken & Drevet, 2020). Els espermatozoides són especialment sensibles a l'EO, ja que presenten un gran nombre de mitocòndries que generen radicals lliures d'oxigen (ROS) i, a la vegada, tenen una alta concentració d'àcids grassos poliinsaturats (PUFA) a la seva membrana, els quals són altament susceptibles a l'atac del ROS (Aitken & Drevet, 2020; Fatima, 2018). A més a més, els espermatozoides disposen d'un baix poder antioxidant degut a que no tenen activitat transcripcional ni traduccional (Fatima, 2018). En conseqüència, l'estudi de l'EO i la fragmentació del DNA espermàtic podria resultar important en el procés de diagnòstic i el pronòstic d'homes infèrtils (Agarwal, 2019; Aitken and Drevet, 2020; Garcia-Segura et al, 2020; Oliva, 2006). Amb aquest objectiu s'han aplicat nombroses tècniques diferents en diversos estudis, però actualment no està clar quina o quines son les que poden resultar clínicament rellevants en vistes al tractament dels pacients infèrtils (Domínguez-Fandos et al., 2005; Domínguez-Fandos et al., 2007; Castillo et al., 2011; Ribas-Maynou et al., 2012; Ballescà et al., 2012; Ballescà et al., 2013; Mateu et al., 2017).

En aquest estudi pilot es pretén comparar entre diferents tècniques moleculars que quantifiquen l'estat oxidatiu (tant del semen com de l'espermatozoide) i la integritat de la cromatina espermàtica amb la finalitat de trobar correlacions i poder determinar quina/es seria/en òptima/es per una futura implementació a la clínica com a complement a l'estudi bàsic del seminograma.

## MATERIAL I MÈTODES

**Mostres biològiques.** S'han obtingut mostres de semen, sota el consentiment previ, de pacients masculins que consulten per infertilitat primària a l'àrea d'andrologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Des del maig del 2021 fins al gener del 2022 s'han reclutat 27 homes que presentaven un seminograma alterat, però sense causes hormonals o genètiques conegudes. Les mostres han estat recollides després de 3-5 d'abstinència sexual i l'avaluació dels paràmetres seminals s'ha dut a terme seguint les guies de la OMS.

**Avaluació del potencial reducció-oxidació del semen a través del sistema MiOXSYS.** El sistema gavanostàtic MiOXSYS (Aytu BioScience, Englewood, CO, USA) és un dispositiu de mesura de la transferència d'electrons entre els compostos reductors i oxidants presents al plasma seminal. Concretament, aquest sistema mesura l'equilibri entre l'activitat oxidant total (EROS, tiols oxidats, radicals superòxid i hidroxil, peròxids d'hidrogen, òxids nítrics, peroxinitrits, etc.) i l'activitat total dels agents reductors (tiols lliures, ascorbats, α-tocoferols, ß-carotens, etc.). Actualment el sistema MiOXSYS es troba molt implementat a la clínica ja que representa una forma fàcil i ràpida d'obtenir el potencial redox de les mostres de semen. El procediment, representat a la Figura 1A, consisteix en dipositar 30 µl d'ejaculat al portamostres d'un sol ús i observar el valor de potencial oxidació-reducció estàtic seminal (*seminal static oxidation-reduction potential,* sORP) en mV. Seguidament, el valor sORP es normalitza respecte a la concentració de la mostra (sORP/C). S'ha considerat que les mostres amb valors superiors a 1,34 mV/$10^6$ espermatozoides/ml presenten un desequilibri entre l'activitat oxidativa i antioxidant i, per tant, EO a l'ejaculat (Agarwal et al., 2016; Agarwal et al., 2019).

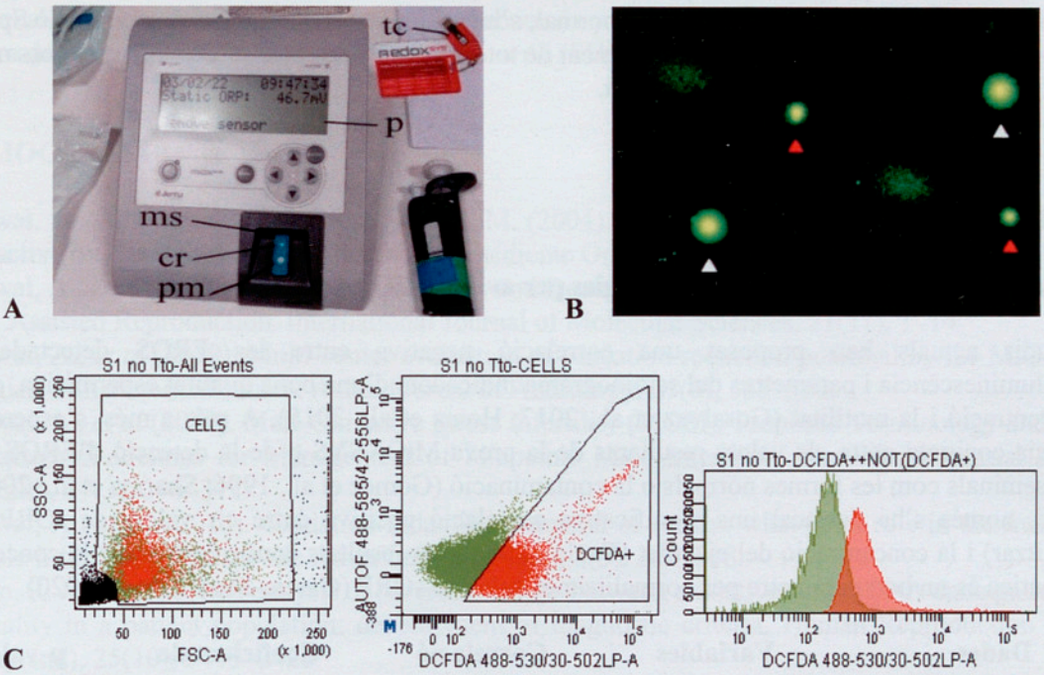


**Figura 1.** Representació de 3 de les 4 tècniques realitzades en el present estudi per a avaluar l'estrès oxidatiu (EO) de les mostres de semen de pacients infèrtils: **A)** Fotografia del dispositiu MiOXSYS, el qual aporta una mesura del potencial d'oxido-reducció estàtic (sORP), on: tc, targeta de calibració; p, pantalla; ms, mòdul del sensor; cr, cel·la de referència; pm, port de la mostra. **B)** Comet neutre visualitzat amb microscòpia de fluorescència, on es poden observar nuclis intactes (sagetes blanques) i nuclis fragmentats (sagetes vermelles). **C)** Resultats de la detecció amb DCFH-DA d'espècies reactives d'oxigen (EROS) intracel·lulars obtinguts mitjançant citometria de flux. A l'esquerra observem la selecció dels *events* corresponents a espermatozoides individuals, i al mig i a la dreta podem distingir dues poblacions d'espermatozoides positius i negatius per a l'assaig.

**Avaluació de la fragmentació del DNA per mitjà de les tècniques de comet alcalí i neutre.** Tot i que l'oxidació del DNA espermàtic no sempre va lligada a la fragmentació de l'ADN, les lesions oxidatives del DNA provocades per les EROS poden generar trencaments de cadena simple o fins i tot doble, (Fatima, 2018; Zandieh et al., 2018). Actualment, s'ha establert l'assaig comet alcalí com el mètode més robust i sensible per detectar trencaments de DNA de cadena simple (Simon L. & Carrell D.T., 2013). A part, existeix la variant de l'assaig comet neutre amb el qual podem observar trencaments de cadena simple

i doble (Agarwal et al., 2020; Ribas-Maynou et al., 2012). Aquestes dues tècniques es basen fonamentalment en una electroforesi on els fragments de DNA migren més que el conjunt de cromatina intacta de manera que finalment, amb l'ajuda d'un marcatge fluorescent, es poden observar els nuclis fragmentats amb una estela en forma de cua de estel (*comet* en anglès), a diferència dels nuclis no fragmentats que es visualitzen grans i rodons (Figura 1B). Mitjançant microscòpia fluorescent s'ha quantificat el percentatge de cèl·lules fragmentades a la mostra (Ribas-Maynou et al, 2012).

**Quantificació dels radicals d'oxigen intracel·lulars mitjançant tinció amb DCFH-DA.** El compost quimioluminiscent, conegut com a DCFH-DA, ha estat utilitzat per a la detecció i quantificació d'EROS presents als espermatozoides. DCFH-DA emet fluorescència en ser oxidat pel peròxid d'hidrogen ($H_2O_2$) intracel·lular i aquesta fluorescència es quantifica mitjançant citometria de flux, permetent la diferenciació de dues poblacions cel·lulars segons la presència de EROS intracel·lulars (Figura 1C) (Agarwal et al., 2004; Homa et al., 2015).

**Anàlisi de dades.** S'han avaluat possibles correlacions lineals entre els paràmetres seminals i els valors obtinguts de les tècniques utilitzades per determinar un possible EO (RStudio Team, 2020). Degut a que no totes les dades segueixen una distribució normal, s'han calculat els coeficients de correlació Spearman (i els p-valors corresponents) en un enfrontament de totes les variables contra totes. Els p-valors no s'han ajustat, ja que el nombre de mostres és reduït.

## RESULTATS I DISCUSIÓ

### Correlacions entre les diferents metodologies per avaluar EO.

Estudis actuals han proposat una correlació negativa entre les EROS detectades amb quimioluminescència i paràmetres del seminograma indicadors d'una bona qualitat espermàtica, com ara la concentració i la motilitat (Gosalvez et al., 2017; Homa et al., 2015). A més a més, s'esperava una tendència conjunta entre els valors resultants de la prova MiOXSYS o de la detecció d'EROS i altres valors seminals com les formes normals o la contaminació (Gomez et al., 1996; Sharma et al., 2001). Pel contrari, només s'ha destacat una significativa correlació positiva entre els valors de sORP (sense normalitzar) i la concentració del ejaculat (Taula 1). Aquests resultats confirmarien que la concentració espermàtica és un bon paràmetre per normalitzar el valor de sORP (Garcia-Segura et al., 2020).

| Dades | Variables correlacionades | Correlació | Coeficient de correlació d'Spearman | p-valor (no ajustado) |
|---|---|---|---|---|
| 23 mostres amb valors complerts | sORP– concentració | (- -) | -0.66 | 0.0004 |
| | sORP/C – EROS | (++) | 0.59 | 0.0037 |
| 10 mostres amb valor d'assaig comet associat | sORP/C – comet alcalí | (+++) | 0.81 | 0.0046 |

**Taula 1.** Anàlisi de correlació entre els resultats de les diferents tècniques moleculars emprades per a avaluar l'EO de les mostres de semen de pacients infèrtils.

Per altra banda, en estudis anteriors s'ha correlacionat positivament un desequilibri en el potencial redox de les mostres i una concentració més gran d'EROS intracel·lulars (Agarwal et al., 2016). En el nostre estudi, efectivament trobem una tendència positiva significativa entre els valors de sORP/C i la detecció de EROS citoplasmàtiques (Taula 1). De forma inesperada, també s'ha identificat una correlació entre els valors resultats de la proba MiOXSYS i la fragmentació de DNA de cadena simple (Aitken et al., 2010; Zandieh et al., 2018), tot i que s'haurà de validar en un número major de mostres, ja que fins el moment només hem pogut analitzar la fragmentació del DNA espermàtic en 10 de les 23 mostres (Taula 1).

## CONCLUSIÓ

Els resultats d'aquest estudi pilot recolzen l'ús del paràmetre seminal concentració per a la normalització dels valors sORP obtinguts gràcies a la tècnica MiOXSYS (Garcia-Segura et al., 2020). De la mateixa manera, referent a la implantació clínica, la tècnica MiOXSYS sembla que podria donar una idea de l'EO de les mostres de semen i, en conseqüència dels pacients que podrien ser bons candidats a un tractament amb antioxidants. No obstant, amb l'assaig MiOXSYS no es podria predir la fertilitat dels individus, ja que els seus valors semblen seguir una tendència conjunta només amb la detecció de trencaments de cadena simple però no de cadena doble (Agarwal et al, 2020). A tot això, es requereix un estudi amb un major nombre de dades per a confirmar les correlacions.

## AGRAÏMENTS

Treball subvencionat per "Ministerio de Economía y Competividad (Spain)" (fondos FEDER 'una manera de hacer Europa') a RO (PI20/00936) i a AI (FI17/00224). JC és professora Serra Húnter.

## BIBLIOGRAFIA

Agarwal, A., Allamaneni, S. S. R., & Said, T. M. (2004). Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. Reproductive Biomedicine Online, 9(4), 466–468.

Agarwal, A., *et al* (2020). The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. International Journal of Molecular Sciences, 21(11), 1–14.

Agarwal, A., *et al* (2019). Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. Asian Journal of Andrology, 21(6), 565–569.

Agarwal, A., *et al* (2019). Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. The World Journal of Men's Health, 37(3), 296–312.

Agarwal, A., *et al.* (2016). Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? Therapeutic Advances in Urology, 8(5), 302–318.

Aitken, R. J., *et al* (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Human Reproduction (Oxford, England), 25(10), 2415–2426.

Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2020). The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. Antioxidants (Basel, Switzerland), 9(2).

Ballescà, J. L., *et al.* (2013). Radicals lliures, antioxidants i qualitat espermática. In XIII Jornada de Biologia de la Reproducció (Vol. 13, pp. 95–98). Societat Catalana de Biologia; filial de l'Institut d'Estudis Catalans.

Ballescà, J. L., *et al.* (2012). Efecto de la administración de un complejo de antioxidantes en pacientes afectos de astenoteratozoospermia idiopática. Revista Internacional de Andrología: Salud Sexual y Reproductiva, ISSN-e 1698-031X, Vol. 10, No. 2, 2012, Págs. 51-56, 10(2), 51–56.

Castillo, J., *et al.* (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. Journal of andrology, 32(3):324–32.

Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Ballescà, J. L., Mezquita, C., & Oliva, R. (2005). Estandardització de la Tècnica de Tunel en Espermatozous. Anàlisis de factors que puguin provocar variacions en els resultats. In IX Jornada de Biologia de la Reproducció (Vol. 4). Societat Catalana de Biologia; filial de l'Institut d'Estudis Catalans.

Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2007). Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 71(12), 1011–1018.

Fatima, S. (2018). Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction. In Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress. IntechOpen.

Garcia-Segura, S., *et al* (2020). Relationship of Seminal Oxidation-Reduction Potential with Sperm DNA Integrity and pH in Idiopathic Infertile Patients. Biology, 9(9), 262.

Gomez, E., *et al* (1996). Development of an Image Analysis System to Monitor the Retention of Residual Cytoplasm by Human Spermatozoa: Correlation With Biochemical Markers of the Cytoplasmic Space, Oxidative Stress, and Sperm Function. Journal of Andrology, 17(3), 276–287.

Gosalvez, J., Tvrda, E., & Agarwal, A. (2017). Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 34(6), 697–707.

Henkel, R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. Asian Journal of Andrology, 13(1), 43–52.

Homa, S. T., *et al* (2015). Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 32(5), 757–764.

Levine, H., *et al* (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. Human Reproduction Update, 23(6), 646–659.

Mateu L, *et al*. (2017). Tratamiento antioxidante en hombres con infertilidad idiopática. Revista Internacional de Andrología, 15(2):45–50.

Oliva R. (2006). Protamines and male infertility. Human reproduction update;12(4):417–35.

Ribas-Maynou, J., *et al* (2012). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. Human Reproduction (Oxford, England), 27(3), 652–658.

RStudio Team. (2020). RStudio. Integrated Development for R. RStudio. http://www.rstudio.com/

Sharma, R., *et al* (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E, 11(1).

Sharma, R. K., *et al* (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. Journal of Andrology, 22(4), 575–583.

Simon L., Carrell D.T. (2013) Sperm DNA Damage Measured by Comet Assay. In: Carrell D., Aston K. (eds) Spermatogenesis. Methods Mol Biol (Methods and Protocols), vol 927. Humana Press, Totowa, NJ.

Skakkebaek, N. E., *et al* (2019). Populations, decreasing fertility, and reproductive health. Lancet (London, England), 393(10180), 1500–1501.

World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen: Vol. SIXTH EDITION (Sixth Edition).

Zandieh, Z., *et al* (2018). Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. Irish Journal of Medical Science, 187(3), 657–662.