



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Pediatría, Obstetricia  
y Ginecología



Efecto del tabaco sobre la calidad seminal:  
Estudio citogenético y molecular del ADN

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

*Thamara A. Viloría Samochin*

Dirigida por:

*Prof. José A. Remohí    Dr. Marcos Mesequer*

*Dr. Nicolás Garrido*

Valencia, 2008

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Pediatría, Obstetricia  
y Ginecología**



VNIVERSITAT  
VALÈNCIA

## **Efecto del tabaco sobre la calidad seminal: Estudio citogenético y molecular del ADN**

**Tesis doctoral presentada por**

*Thamara Viloría Samochin*

***Dirigida por***

*Prof. José A. Remohí Giménez*

*Dr. Marcos Meseguer Escrivá*

*Dr. Nicolás Garrido Puchalt*

**Valencia, 2008**



**Prof. Dr. D. José A. Remohí Giménez**

Catedrático de Obstetricia y Ginecología y Director del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Efecto del tabaco sobre la calidad seminal: Estudio citogenético y molecular del ADN”, ha sido realizado íntegramente por Dña Tamara A. Vilorio Samochin, bajo mi dirección compartida con el Dr. Marcos Meseguer Escrivá y el Dr. Nicolás Garrido Puchalt. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 25 de Abril de 2008

Fdo. Prof. José A. Remohí Giménez

**Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá**

Doctor en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia. Embriólogo del laboratorio de embriología clínica del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Efecto del tabaco sobre la calidad seminal: Estudio citogenético y molecular del ADN”, ha sido realizado íntegramente por Dña Thamara A. Viloría Samochin, bajo mi dirección compartida con el Prof. José Remohí Giménez y el Dr. Nicolás Garrido Puchalt. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 25 de Abril de 2008

Fdo. Dr. Marcos Meseguer Escrivá

**Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt**

Doctor en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia. Director del laboratorio de andrología del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Efecto del tabaco sobre la calidad seminal: Estudio citogenético y molecular del ADN”, ha sido realizado íntegramente por Dña Thamara A. Viloría Samochin, bajo mi dirección compartida con el Prof. José Remohí Giménez y el Dr. Marcos Meseguer Escrivá. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 25 de Abril de 2008

Fdo. Dr. Nicolás Garrido Puchalt

*“A mis padres, Tamara y Rodolfo*

*A mi hermana Tatiana*

*A Marcos”*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Considero que de toda la tesis, el apartado de agradecimientos es el más complicado de escribir, puesto que no solamente es una sección que todo el mundo lee, sino que además es la única que la mayoría de la gente lee. Todos esperan a ver cómo se distribuyen los agradecimientos, qué agradecemos a cada persona, en lo personal o en lo profesional, así que espero quedar bien con todos aunque seguro que me olvidaré de alguien y lo lamentaré eternamente.*

*Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por mi parte y la de mis directores de tesis, no hubiese podido finalizarse sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré, muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos difíciles; a todos... **GRACIAS**. Ahora se cierra un capítulo importante en mi vida, y comienza otro del que espero también sean pieza fundamental.*

*Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período.*

*Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Remohí, a Nico y Marcos, bajo cuya dirección se ha efectuado este trabajo, por su constante apoyo y asesoramiento en todos los aspectos de la investigación y elaboración de esta Tesis así como por la confianza depositada en mí en todo momento.*

*Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país, Venezuela, y está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mi llegada a este país no hubiese sido posible, y por tanto, nada de lo que he podido desarrollar hasta ahora tanto profesional como personalmente.*



*A mis padres Tamara y Rodolfo, mi inspiración!!!, definitivamente la inherencia familiar ha sido clave en mi inclinación a las ciencias biológicas. Gracias por estar allí en **TODO** momento, porque aún con los miles de kilómetros que nos distancian, nunca me ha faltado la voz y el hombro amigo, y mi lucha en tierras extrañas ha sido también la suya y, a pesar de todo, han soportado sobrehumanamente nuestra separación (que solo ha sido física). A mi hermana y mejor amiga, por ser ese cascabel en mi vida, porque a pesar de la distancia, nunca para de sonar y porque el ánimo, apoyo y alegría que me brinda me da la fortaleza necesaria para seguir adelante. A ellos 3 les debo **TODO LO QUE SOY!!!** ... Siempre me han animado a realizar mis sueños y se han implicado en mi historia.*

*A Antonio, Norma, Carlos, M<sup>a</sup> José, y todo el equipo de CEVALFES quienes en Venezuela, junto a mi padre, me iniciaron en el maravilloso mundo de la reproducción humana y despertaron ese gusanito que me trajo hasta tierras valencianas (con la idea de que fuera temporal, jajajaja.... Que equivocados estábamos todos... y yo la primera). A Alicia por ser mi compañera de batallas en CEFESMAR y, que aunque la dejé solita se alegra mucho por mi presente.*

*A los Dres. Pellicer, Remohí, Simón y Amparo Ruiz, quienes me abrieron las puertas en IVI-Valencia, mi más sincera admiración y más profundo agradecimiento por permitirme la continuidad de esta maravillosa experiencia en uno de los mejores centros de reproducción del mundo.*

*A aquellos con quienes compartí mis primeras andanzas en el IVI y los que siguieron agregándose. A Nico y Marcos, los "zipi y zape" de la época, mil gracias por estar allí en todo momento y ser pieza principal de toda esta historia. A "la Peque", a Ali Zurrilla, Yoli, con quienes compartí risas y lágrimas (muchas de estas últimas en esa época), al SUPER Pepe-An quien ha sido un apoyo indescriptible en todas las fases de la tesis. A Carol, Isabelita, Paloma, Ali Mencías, Vicente, por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo, sin ell@s estas muestras no podrían estar recogidas (no literalmente,*

*jajaja), y por estar siempre pendientes de en cuál fase de la tesis estaba y cómo la llevaba.*

*Gracias a mis compañeros de laboratorio, no voy a dar nombres, porque ya somos muchos y seguro alguien se me olvidará sin quererlo; algunos han compartido este reto desde el principio, otros han estado de paso, pero todos de alguna manera han dejado una huella en mi y han formado parte de esto. En general, a TOD@S mis compañer@s de FIV: técnicos, biólog@s, secres, auxiliares de quirófano. El subir a la 3ª planta fue todo un reto, fue descubrir el mundo de la embriología que luego me creó dependencia. A mis compis de FISH y DPI: biólog@s y técnicos, con quienes he compartido momentos entrañables y aprendido muchas cosas durante las largas horas de hibridación, jajaja; me facilitaron el poder asistir a todos mis cursos de doctorado y fueron un gran apoyo técnico y emocional para desarrollar esta tesis. Sin embargo, aunque no quiero restar importancia a todos los demás, quiero dar mi mas sincero agradecimiento a una persona muy especial, que además de apostar por mi, ha sido una amiga incondicional y guía... y sin duda, mucho de lo que he logrado hasta ahora no hubiese sido posible sin su ayuda... A Mari Carmen.*

*Así también a todo el personal del IVI-Valencia: Secretaría, Dirección, Recepción, Administración, Laboratorios, Informática, Auxiliares, Enfermeras, Celadores, Biblioteca, Mantenimiento, Limpieza, ya que dentro de los ámbitos que a cada uno competen, han compartido mi día a día, me han colaborado y me han brindado siempre una sonrisa.*

*A los amigos de Venezuela y para siempre mis mejores amigos: Nella, Daniel, Iván, Migdalia, Marianella, Juancho, Ambar, por ayudarme a crecer y madurar como persona, porque gracias a ustedes sé lo que es la amistad verdadera, valor importante en mi vida, LOS RECUERDO y los EXTRAÑO un montón; y a los del presente: mis amigos, compadres y pedacito de mi tierra en España: Nina y Luis. A Marquitos, Vicente, Natalia, Pili, Carlos, y al resto*

*del "suecan group", por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles.... también son parte de esta alegría.*

*A mi familia española: mis suegros, la Sra. Pilar y el Sr. Juan, a la Sra. Pura, a mis cuñados Mar y Carlos, a mi sobrina María, quienes me han brindado todo el apoyo y cariño, por quienes hoy por hoy puedo afirmar que, a pesar de haber venido sola a continuar mis estudios, jamás me he sentido así, porque ellos han estado a mi lado cada día durante estos años.*

*Finalmente, a "mi catire bello" (Marcos): **MIL GRACIAS !!!!**.... Has sido el último a quien agradecer, pero no el menos importante. Desde que te conocí has sido y eres MI TODO: mi motor de vida, mi inspiración científica, mi maestro, mi esposo y mejor amigo; y además director de esta tesis. Gracias por estar a mi lado siempre; porque en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Por ti ha valido la pena esta gran aventura..... eres mi vida.*

---

**ÍNDICE**

	Pág.
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 Infertilidad.....	7
1.2 El factor masculino.....	7
1.3 El cigarrillo.....	9
1.4 Otras generalidades:	
1.4.1 Calidad seminal.....	12
1.4.2 Sex ratio.....	13
1.4.3 Anomalías cromosómicas en espermatozoides.....	16
1.4.4 Fragmentación del ADN.....	17
1.4.5 Sistema antioxidante: sistema glutatión.....	19
1.4.6 Daño oxidativo al ADN (estrés oxidativo).....	24
<b>2.- OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo general.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
<b>3.-DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>33</b>
3.1 Diseño.....	35
3.2 Lugares de ejecución.....	35
<b>4.- HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 Población.....	45
5.2 Muestra en:	
5.2.1 Calidad seminal y tabaco.....	47
5.2.2 Sex ratio (espermatozoides y embriones) y tabaco.....	47
5.2.3 Anomalías cromosómicas de espermatozoides y tabaco.....	49

---

5.2.4 Fragmentación del ADN espermático y tabaco.....	49
5.2.5 Sistema antioxidante y tabaco.....	49
5.2.6 Daño oxidativo al ADN espermático.....	50
5.3 Procesamiento de las muestras.....	50
5.3.1 Análisis básico del semen.....	50
- Recogida de la muestra.....	50
- Examen macroscópico.....	51
• <i>Licuefacción y viscosidad</i> .....	51
• <i>Aspecto</i> .....	51
• <i>Volumen</i> .....	51
• <i>pH</i> .....	52
- Examen microscópico.....	52
• <i>Preparación de la muestra</i> .....	52
• <i>Movilidad</i> .....	53
• <i>Aglutinación</i> .....	54
• <i>Concentración</i> .....	55
• <i>Morfología</i> .....	56
5.4 Recuperación espermática.....	58
3.4.1 Técnica de “swim-up”.....	58
5.5 Hibridación In Situ Fluorescente (FISH).....	59
5.5.1 FISH de espermatozoides.....	60
- <i>Fijación de las muestras de eyaculado</i> .....	60
- <i>Hibridación con sondas de ADN fluorescentes</i> .....	62
• <i>Protocolo de hibridación</i> .....	62
a) <i>Descondensación</i> .....	62
b) <i>Desnaturalización</i> .....	63
c) <i>Hibridación</i> .....	63
d) <i>Detección</i> .....	63
• <i>Interpretación de las señales de hibridación</i> ..	64
5.6 Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).....	68
5.6.1 Biopsia embrionaria.....	69

---

5.6.2 Fijación de blastómeros.....	70
5.6.3 FISH de blastómeros.....	70
5.7 Fragmentación del ADN espermático:	
Prueba de Dispersión de la Cromatina SCD.....	72
5.8 Sistema antioxidante y estrés oxidativo.....	75
5.8.1 Extracción de ARN mensajero y retrotranscripción (RT)- PCR.....	75
5.8.2 PCR semicuantitativa fluorescente (qf-PCR).....	78
5.8.3 Mediciones de actividad enzimática.....	80
5.8.4 Contenido de GSH.....	81
5.8.5 Determinación del daño oxidativo del ADN espermático.....	82
5.8.6 Medición de la 8-oxoguanina por citometría de flujo.....	83
5.9 Análisis estadístico para relacionar:	
5.9.1 Calidad seminal y tabaco.....	85
5.9.2 Sex ratio, aneuploidías y tabaco.....	85
5.9.3 Fragmentación del ADN y tabaco.....	85
5.9.4 Estrés oxidativo, sistema antioxidante y tabaco.....	86
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
6.1 Parámetros seminales y tabaco.....	91
6.2 FISH de espermatozoides y tabaco.....	92
6.3 FISH de embriones y tabaco.....	93
6.4 Fragmentación del ADN y tabaco.....	96
6.5 Sistema antioxidante y tabaco.....	101
6.6 Oxidación del ADN espermático y tabaco.....	104
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>127</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**





## **1.1 Infertilidad**

El término “Infertilidad” se define como la imposibilidad de una pareja de conseguir un embarazo tras mantener relaciones sexuales regulares no protegidas durante un año. Aproximadamente un 15% de las parejas con deseo de gestación tienen dificultad de concebir tras este período (Strickler y cols. 1975). Las causas de la infertilidad abarcan un amplio rango de factores tanto físicos como emocionales y puede atribuirse a cualquier alteración en el sistema reproductor femenino o masculino, que contribuyen en menor o mayor medida a este hecho.

En muchos casos, la etiología se distribuye prácticamente de forma equitativa entre factor masculino, disfunción ovárica y factor tubárico. Un porcentaje menor de los casos se atribuyen a la endometriosis, factor uterino o cervical y otras causas; en otras parejas la etiología es multifactorial, pero en aproximadamente una cuarta parte de las parejas con imposibilidad de lograr un embarazo, la causa es de “origen desconocido” (Jose-Miller y cols. 2007).

Este último grupo es muy importante, ya que se trata de un porcentaje considerable del total de parejas que cursan con problemas para concebir, donde no hay una causa determinada y todos los parámetros aparentan ser “normales”, al que se debería prestar una mayor atención e investigar más a fondo ya que básicamente implica una falta de información tanto a nivel molecular como celular de las distintas etapas implicadas en el proceso reproductivo.

## **1.2 El factor masculino:**

El *factor masculino*, que es la base fundamental del presente trabajo, se refiere a todas las causas que dificultan el proceso reproductivo y tienen su origen en el varón, y es por sí solo el causante de la infertilidad en un 20% de los casos y contribuye en otro 30-40%,

siendo las alteraciones en el semen el principal origen de la misma (Rodríguez y cols., 2005).

Tradicionalmente, la evaluación del varón en el estudio de la pareja infértil se ha basado en la evaluación microscópica y ensayos bioquímicos para determinar la calidad del semen. El análisis de semen se realiza siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization. 2001) a excepción de la morfología en la que frecuentemente se siguen los criterios de Krüger (Kruger and Coetzee. 1999).

Los índices macroscópicos (descritos posteriormente en materiales y métodos) valoran la función de las glándulas excretoras. El volumen del plasma seminal, está condicionado por la secreción de las vesículas seminales en un 80% y el resto es de próstata, glándulas bulbouretrales y epidídimo; la licuefacción es la resultante de la acción de las enzimas proteolíticas del plasma seminal; y el olor es condicionado por la seminina y seminogelina. El pH está dado por la presencia de fructuosa que proviene de las vesículas seminales, así como del ácido cítrico y fosfatasa ácida que son secretados por la próstata. Los índices microscópicos más importantes (descritos posteriormente en materiales y métodos) son la concentración espermática que valora la función testicular y la permeabilidad de los conductos excretorios; la movilidad y morfología espermática, que valoran la función de los epidídimos y la interacción de los espermatozoides con el plasma seminal. La aglutinación, presencia de leucocitos, células epiteliales y detritus pueden encontrarse en el plasma seminal, sin embargo cuando se incrementan en número o porcentaje son signos patológicos (Tapia y cols, 2003).

Aún cuando estos parámetros son importantes en la valoración inicial, el análisis básico del semen, como herramienta única, es insuficiente para determinar el estatus del varón infértil (Lewis. 2007).

El sistema reproductivo es bastante complejo, sin embargo, los diseños experimentales de pruebas *in vitro* e *in vivo* nos pueden ser útiles para detectar algunas alteraciones. Por tanto, la reproducción asistida nos brinda un espacio ideal para estudiar algunos factores que podrían estar afectando la calidad seminal y sus implicaciones a nivel reproductivo.

A lo largo de los años, muchos han sido los factores relacionados con la infertilidad masculina, como: infecciones, varicocele (Pomerol 2002), obstrucciones y alteraciones en la producción espermática (Ballescá 2002), causas genéticas (Egozcue 2002), entre otras. Muchas veces la causa es desconocida y pueden afectar en mayor o menor medida a la calidad seminal. Sin embargo, su relación con los hábitos tóxicos ha sido motivo de investigación en los últimos años; de sus resultados se han descrito algunos agentes ambientales tóxicos que pueden deteriorar la espermatogénesis, ejerciendo efectos nocivos a nivel pre-testicular, testicular o post-testicular (Oliva y cols. 2001, Pflieger-Bruss y cols. 2004). Uno de estos agentes es el tabaco; el cual está ampliamente reconocido como un problema de salud pública y una de las mayores causas de muertes prevenibles. Aproximadamente una tercera parte de la población mundial mayor de 15 años, es fumadora (World Health Organization, 1997). Así mismo, el tabaco afecta la salud reproductiva.

### **1.3 El cigarrillo:**

El cigarrillo, contiene algunos cientos de compuestos (Dube y Green, 1982) consistentes en su mayoría de carbohidratos y proteínas (aprox 50%). Otro constituyente significativo son alcaloides (0,5-5%), con la nicotina como compuesto predominante (90-95% de los alcaloides totales), polifenoles (0,5-4,5%), fitosteroles (0,1-2,5%), ácidos carboxílicos (0,1-0,7%), hidrocarburos aromáticos, aldehídos, cetonas, aminas,

pesticidas, etc (0,01-5%) y más de 30 compuestos metálicos (Wynder y Hoffmann, 1967; Internacional Agency for Research on Cancer, 1986).

La nicotina, el principal alcaloide del tabaco, está presente en los cigarrillos en una cantidad que varía desde 0,8-1,8 mg/cigarrillo, dependiendo de la marca y tamaño del mismo (Benowitz y cols. 1983, Rosa y cols. 1992). Hasta 1mg de nicotina puede ser absorbido al fumar 1 solo cigarrillo. Este es un alcaloide muy tóxico que se absorbe rápidamente por el tracto respiratorio, la mucosa bucal y la piel (Gandini y cols. 1997)

La cotinina, su mayor metabolito, es un compuesto más estable que la nicotina, con un tiempo de vida media de aproximadamente 20 horas (la nicotina tiene sobre 2 horas) y su concentración no se ve influenciada por otros factores como por ejemplo la dieta. En el hombre, la nicotina y/o cotinina ha sido detectada en plasma seminal de acuerdo al consumo de cigarrillos (Pacifici y cols. 1993, Vine y cols. 1993, Vine. 1996, Zenzes y cols. 1999). Lo cual indica el paso de estos metabolitos a través de la barrera hemato-testicular.

Esto sugiere que ciertos componentes del tabaco (**Fig 1**) interactúan directa o indirectamente afectando la función y viabilidad de los gametos; sin embargo, el mecanismo que envuelve este resultado aún necesita ser elucidado.



**Fig 1.:** Algunos compuestos encontrados en un cigarrillo

El incipiente incremento del interés público respecto al declive del potencial fértil masculino, y sobre todo, el deseo de conocer el efecto que tienen los componentes medioambientales y ocupacionales, y los hábitos de la sociedad actual, hacen necesarios estudios serios, objetivos y completos que revelen la acción que estos ejercen en el espermatozoide, principalmente en población con deseos de gestación.

Con este fin, hemos aprovechado el conocimiento ganado en los tratamientos de reproducción asistida (TRA) después de la introducción diversos análisis como: el análisis cromosómico por hibridación *in-situ* fluorescente (FISH), el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), el test de la dispersión de la cromatina (SCD) para el estudio de la fragmentación del ADN; así como otros marcadores de fertilidad masculina como la medición del daño oxidativo al ADN espermático; que nos permitan comprender algunos acontecimientos moleculares que puedan conducir a la subfertilidad de origen idiopático ante agentes tóxicos como el cigarrillo en el hombre.

Empleando estas técnicas, hemos hecho un seguimiento del efecto del tabaco sobre:

- a) Calidad seminal.
- b) Ratio Y:X de los espermatozoides y sex ratio de los embriones procedentes de los mismos.
- c) Anomalías cromosómicas en espermatozoides.
- d) Integridad del ADN espermático.
- e) Defensa oxidativa del espermatozoide.
- f) Daño oxidativo al ADN espermático

Este estudio introduce nuevos avances respecto a las consecuencias del tabaco en la reproducción humana.

## **1.4 Otras generalidades**

### **1.4.1 Calidad seminal:**

En el diagnóstico de la infertilidad masculina, el análisis básico del semen constituye un elemento fundamental. Los parámetros que se valoran, según los criterios de la OMS (WHO, 1999) son: volumen del eyaculado, concentración de espermatozoides, movilidad y morfología de los espermatozoides.

El objetivo de realizar el análisis microscópico del semen es estimar las posibilidades que presentan las características del eyaculado para poder iniciar un embarazo que se pueda llevar a término o para elegir las técnicas de reproducción asistida que ofrezcan mejores expectativas (Garrido y cols., 2002).

Sin embargo, son muchos los factores externos que se han descrito que pueden afectar la calidad seminal, siendo el cigarrillo uno de los más importantes debido a que forma parte de un hábito común en la sociedad actual.

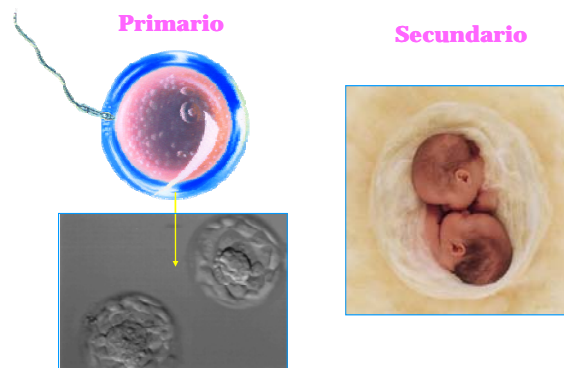
Existen muchos trabajos controvertidos en la literatura; algunos de ellos demuestran un efecto perjudicial del tabaco en la calidad seminal de pacientes infértiles (Kunzle y cols. 2003), en los cuales se ha hallado una disminución en la concentración espermática, número total de espermatozoides móviles, morfología normal, concentración de citrato y pH (Kunzle y cols. 2003, Shi y cols. 2001, Vine y cols. 1994, Vine y cols. 1996, Zitzmann y cols. 2003). Sin embargo, otros autores han publicado que el tabaquismo no parece afectar la calidad espermática en hombres fértiles (Chia y cols. 1998). Martini y cols. (2004) no encontraron diferencias estadísticas en los parámetros seminales de una población grande de hombres atendidos en el laboratorio de andrología según el consumo de alcohol o tabaco. Sin embargo, cuando éstos pacientes fueron comparados con aquellos que no poseían estos hábitos, se pudo detectar una disminución significativa en el volumen

seminal, la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides móviles.

El mecanismo por el cual el tabaco afecta al espermatozoide aún no es del todo conocido, pero debido a que contiene más de 30 agentes químicos conocidos como mutágenos o carcinógenos, en los sistemas modelo se han determinado efectos directos sobre las células germinales masculinas o los embriones. Por consiguiente, se ha descrito que los hombres fumadores han disminuido el éxito en las terapias de reproducción asistidas (ART). Partiendo de esta base, en este trabajo se plantea estudiar el efecto del tabaco sobre los distintos parámetros seminales, en aquellos pacientes que asisten a nuestro laboratorio de andrología, tras una consulta de infertilidad.

#### 1.4.2 **Sex ratio:**

El sex ratio se define como la “proporción hombre: mujer” (XY:XX) que existe en una población, usualmente expresado como el número de hombres por cada 100 mujeres (a pesar de no ser un término castellano, por razones de facilidad y sintaxis, de este punto en adelante se seguirá denominando “sex ratio” a dicha proporción) . Hay 2 tipos de sex ratios, el *primario* que es el ratio al momento de la concepción y el *secundario*, que es el ratio al momento del nacimiento (**Fig 2**).



**Fig 2:** Clasificación del sex ratio

En teoría, los seres humanos producen una igual proporción de niños que de niñas. Sin embargo, ni en la concepción ni en el nacimiento están ambos sexos representados igualmente. Los cambios ambientales e individuales desempeñan un papel importante en las desviaciones observadas. Un mediador puede ser las variaciones hormonales individuales (genético), así como las variaciones ambientales y su influencia en gametogénesis, implantación y desarrollo embrionario.

En líneas generales, en la especie humana la proporción ha sido de 106 hombres por cada 100 mujeres (ratio=1,06), pero en las últimas décadas se ha evidenciado que el ratio XY:XX ha sufrido una disminución importante en muchos países industrializados (Davis y cols. 1998, Moller. 1996). Aunque la razón de esta tendencia no está completamente descifrada, la exposición a diversos agentes ambientales tóxicos (Mocarelli y cols. 2000, Sakamoto y cols. 2001) y el estrés (Fukuda y cols. 1998) se han precisado como posibles causas.

Estudiando las épocas de guerras, se ha observado una disminución del sex ratio en los recién nacidos vivos (RNV); entre ellas figuran la experimentada tras los 10 días de guerra en Eslovenia en 1991 (Zorn y cols. 2002), que coincide con la disminución observada tras la guerra de Irán-Irak (1980-1988) (Ansari-Lari and Saadat. 2002) y también tras terremoto de Kobe (Japón-1995) (Fukuda y cols. 1998). Estos autores sugieren que el cambio en el sex ratio secundario en estos pacientes podría deberse a alguna de las siguientes causas: una disminución en la movilidad espermática que afecta más al espermatozoide portador del cromosoma "Y", a la exposición a gases tóxicos o al estrés psicológico. Bisioli (2004), plantea que se podía considerar como una observación post-guerra, ya que en estos períodos hubo mucha mortalidad masculina y que posterior a las guerras podría haber surgido un posible proceso adaptativo de equilibrio poblacional



donde las mujeres concebían mayor número de niñas que podrían reproducirse posteriormente con mayor facilidad y volver al balance aproximado 1:1; sin embargo, éste resulta ser una propuesta bastante controvertida y difícil de justificar científicamente.

Algunos reportes recientes también han relacionado esta disminución al hábito de fumar. Fukuda y cols. (2002) estudiaron el hábito de fumar durante el período periconcepcional en más de 5000 parejas y encontraron una disminución en el ratio XY:XX de los niños cuyas madres y padres fumaban más de 20 cigarrillos al día (cig/día). Posteriormente, Mills y cols. (2003) estudiaron a más de 26000 mujeres durante un período mayor de 15 años pero no encontraron asociación alguna con el hábito de fumar de la mujer, sin embargo el ratio XY:XX había disminuido en ese período de tiempo, indicando así que el efecto del cigarrillo sobre el sex ratio de la descendencia podría no estar atribuido a efectos ambientales maternos; por tanto les surge la hipótesis que no puede excluirse la posibilidad de que el tabaco pueda selectivamente matar o dañar el espermatozoide portador del cromosoma Y.

Sin embargo, no hay referencias en la literatura acerca del posible efecto del tabaco sobre el testículo que pueda producir un daño en el espermatozoide portador del cromosoma Y que genere una posterior disminución del ratio XY:XX; lo cual lograría explicar las tendencias encontradas los recién nacidos vivos en los estudios realizados hasta ahora. Además, hasta el momento no se ha estudiado cuidadosamente el efecto del tabaco en la selección de los espermatozoides X e Y antes y después del capacitado, durante la fertilización o en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

En una tentativa de clarificar de qué manera el consumo de cigarrillos podría alterar el ratio XY:XX, ha sido de gran interés evaluar la proporción de espermatozoides X e Y presentes en el eyaculado, así

como también las tasas de fertilización y el porcentaje de los embriones masculinos y femeninos en el día 3 de desarrollo embrionario en un grupo de parejas infértiles que asisten a nuestro laboratorio de DGP.

### **1.4.3 Anomalías cromosómicas en espermatozoides:**

El daño cromosómico de los espermatozoides puede servir como un marcador de los efectos adversos en el sistema reproductor masculino luego de diversas exposiciones durante períodos sensitivos de la espermatogénesis. Se han desarrollado algunas pruebas de laboratorio para detectar directamente y medir los daños cromosómicos en las células espermáticas humanas. La Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) es una de estas pruebas que, mediante el uso de sondas de ADN para cromosomas específicos, se ha convertido en una de las más utilizadas para estimar la frecuencia de aneuploidías en las células germinales masculinas (Robbins y cols. 1993). Han sido varios los factores que se han descrito que pueden incrementar el riesgo en los hombres de producir espermatozoides aneuploides, incluyendo edad (Griffin y cols. 1995, Robbins y cols. 1995), tratamientos con quimioterapia por cáncer, y ciertos factores asociados a los estilos de vida (Robbins y cols. 1997), entre otros.

Algunos trabajos han reportado un incremento de anomalías cromosómicas en los espermatozoides de hombres que fuman comparado con aquellos que no tienen este hábito. Rubes y cols. (1998) y Potts y cols. (1999), encontraron un aumento significativo de aneuploidías YY en hombres fumadores sanos (parámetros seminales normales según la OMS) con respecto a los no fumadores. Robbins y cols. (1997) estudiaron el efecto del fumar cigarrillos sobre las aneuploidías de los cromosomas sexuales, comparando hombres fumadores sanos y no fumadores, encontrando una mayor incidencia de aneuploidías XX.

En el presente estudio, se pretende analizar y comparar la incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides de hombres no fumadores, fumadores moderados y muy fumadores en un grupo de pacientes infértiles que asisten a nuestro laboratorio de DGP.

#### **1.4.4 Fragmentación del ADN:**

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término, tanto *in vivo* como *in vitro* (Muriel y cols. 2006a). Espermatozoides con ADN dañado (**Fig 3**) pueden fertilizar ovocitos en metafase II con la misma eficacia que espermatozoides con ADN intacto (Aitken y cols. 1998). Sin embargo la presencia en el embrión de ciertas modificaciones, a nivel de nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del ADN procedentes del complemento genómico paterno (que no hayan sido reparadas por el ovocito después de la fertilización), es incompatible con un desarrollo embrionario y fetal normal (De Jonge. 2002).



**Fig 3.:** Representación de la fragmentación del ADN en el espermatozoide.

Se estima que un 25% de las causas de infertilidad son de origen idiopático y la etiología de algunas de estas causas podría estar relacionada con daño en el ADN de los espermatozoides.

Hay que puntualizar que el daño que se pudiera encontrar en el embrión no tiene por qué estar exclusivamente relacionado con el daño en el ADN del espermatozoide que haya fecundado al ovocito; este daño podría provenir también del ovocito o de ambos. Sin embargo, dado que el análisis de fragmentación de ADN en gametos es destructivo y que este daño podría variar de un ovocito a otro y que su número es limitado, no se ha podido estudiar la existencia de esta patología en ellos, por ello su análisis se ve focalizado en el espermatozoide.

Por otra parte, aún cuando el análisis de la fragmentación de ADN en el espermatozoide se muestra como una herramienta útil en el estudio de la infertilidad masculina de origen desconocido (Muriel y cols. 2006b, Sergerie y cols. 2005), diversos estudios realizados por nuestro grupo, han observado que la fragmentación del ADN no guarda una relación demasiado relevante a nivel clínico con la tasa de fecundación en ciclos de fecundación *in vitro* (FIV), con la de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Muriel y cols. 2006a), ni tampoco con la tasa de embarazo en ciclos de inseminación intrauterina (IUI) (Muriel y cols. 2006b), sugiriendo que podría ser un análisis más en el estudio del varón infértil, mas no indispensable debido a su escaso valor predictivo.

Aunque el origen del daño a nivel del ADN no es claro (Muratori y cols. 2000, Sergerie y cols. 2005), se han propuesto algunos mecanismos como: defectos en la compactación de la cromatina durante la espermiogénesis, inducción de la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis e inducción de daño de ADN en espermatozoides diferenciados maduros por espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de radicales libres (Garrido y cols. 2004a).

Una causa potencial de la fragmentación de ADN es la exposición a toxinas ambientales; sin embargo, hay pocos datos que apoyan el concepto de un impacto negativo extenso de contaminantes ambientales en los resultados del análisis del semen (Sun y cols. 1997). Algunas de estas toxinas se podrían relacionar con el consumo de cigarrillos.

La relación entre el cigarrillo y la fragmentación del ADN del espermatozoide ha sido establecida por algunos autores (Muratori y cols. 2000, Sun y cols. 1997, Zenzes. 2000). No obstante, Sergerie y cols. (2005) han reportado una “no” asociación en hombres sanos fumadores y no fumadores; mientras Belcheva y cols. (2004), encontraron que el daño en el ADN de los espermatozoides de los fumadores estaba incrementado con respecto al de los no fumadores, pero esta diferencia no resultaba estadísticamente significativa.

Uno de los mecanismos sugeridos podría estar relacionado con la interferencia nicotínica sobre la organización de la membrana espermática y por lo tanto en la reacción acrosómica inducida por ZP3 (Arabi. 2004), una proteína de la zona pelúcida que desempeña un papel fundamental durante la fertilización, funcionando como un receptor específico para el espermatozoide (Hinsch y cols. 2005).

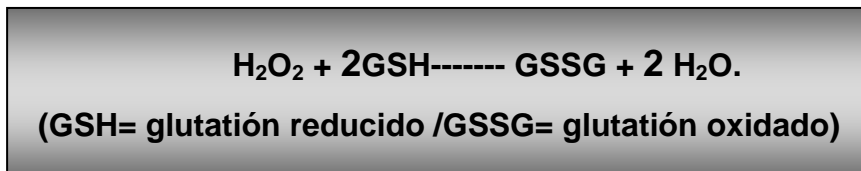
El propósito en este estudio es investigar la asociación entre el consumo de tabaco y la fragmentación de ADN del espermatozoide en parejas infértiles sometidas a tratamientos de reproducción asistida, utilizando el Test de la Dispersión de la Cromatina (SCD) antes y después del procedimiento de swim-up como técnica de capacitación espermática en hombres fumadores y no fumadores.

#### **1.4.5 Sistema Antioxidante: Sistema Glutatión:**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son agentes oxidantes altamente reactivos y forman parte de una clase de moléculas conocidas

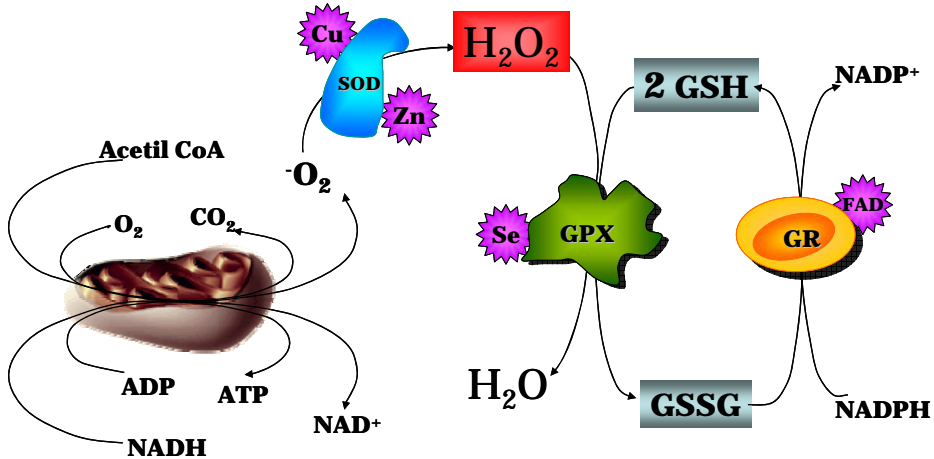
como radicales libres (RL) (Sheweita y cols. 2005). Las ROS se producen continuamente en el organismo durante el metabolismo celular normal y en algunas ocasiones como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarrillo, entre otros. Éstos, provocan una reacción en cadena que modifica la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido en ácidos grasos polinsaturados. Cada RL formado en el organismo inicia una serie de reacciones en cadena que continúan hasta que son eliminados; algunos de éstos son: el anión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico (Herrero and Gagnon. 2001); sin embargo, existen otras moléculas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no son radicales libres pero que actúan fisiológicamente como tal.

El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos producidos por los radicales libres. Entre los antioxidantes primarios se encuentra la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Esta familia de enzimas la componen una serie de isoformas que son capaces de detoxificar, convirtiendo el  $H_2O_2$  y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas (como alcoholes estables o agua), antes de que formen radicales libres (**Fig 4**). La enzima glutatión peroxidasa cataliza la siguiente reacción:



En conjunto con ésta reacción, la enzima glutatión reductasa (GR) cataliza el proceso por el cual el glutatión oxidado (GSSG) pasa a

glutatión reducido (GSH), renovando así las reservas de las que depende la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (**Fig 4**).

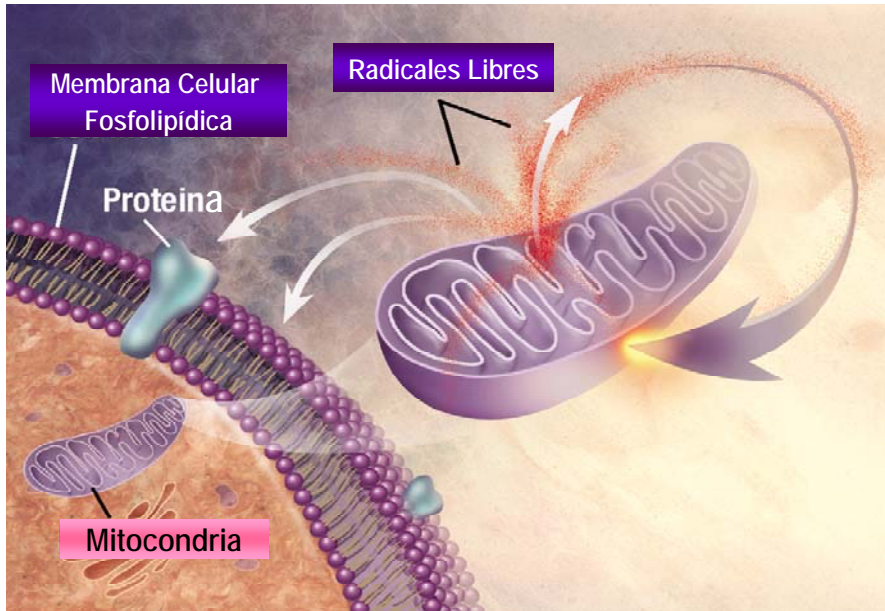


**Fig 4:** Esquema de acción enzima glutatión peroxidasa (GPx) en la eliminación de los radicales libres

Existen numerosos estudios que han demostrado la vulnerabilidad del espermatozoide humano a los RL, sin embargo, el proceso por el cual se produce este fenómeno no está completamente esclarecido (Aitken and Baker. 2002, Alvarez y cols. 1987, Kemal Duru y cols. 2000, de Lamirande and Gagnon. 1992a, de Lamirande and Gagnon. 1992b).

Por el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados en su membrana plasmática, el espermatozoide es altamente vulnerable a la acción peroxidativa de los radicales libres (**Fig 5**). Un aumento en los niveles de RL sugiere un alto estrés oxidativo (OS) que podría inhibir la acción de reacciones enzimáticas reguladoras como la conversión a través de la catalasa de estos RL a agua, o a una disminución en la expresión de sistemas enzimáticos. En el espermatozoide

específicamente, entre los sistemas enzimáticos involucrados en la neutralización del OS se ha observado la presencia de algunas enzimas como: la superóxido dismutasa ( $SOD^-$ ) (un antioxidante primario que convierte al  $O_2^-$  en  $H_2O_2^-$ ), la catalasa, y del sistema glutatión peroxidasas (GPXs) y glutatión reductasa (GR) (Alvarez y cols. 1987).

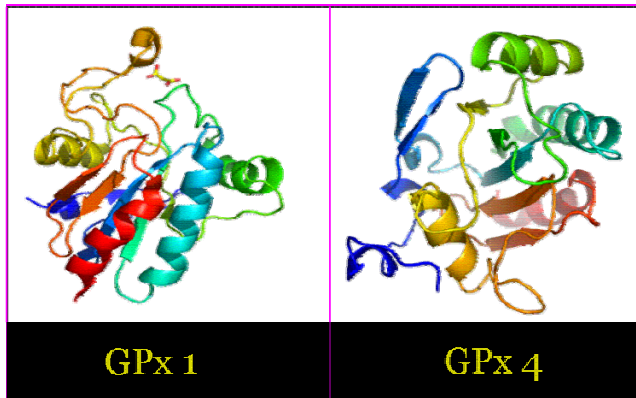


**Fig 5:** Acción de los radicales libres sobre la membrana plasmática

Dentro del GPXs se encuentra la enzima intracelular GPx-1 (**Fig 6**) que es ubicua, y en el espermatozoide y en el tracto genital está directamente relacionada con la movilidad espermática. Por otro lado, se encuentra la enzima GPx-4 (**Fig 6**) que está altamente presente en todo el tejido testicular (más que en otros) y ha sido relacionada directamente con la infertilidad masculina; así mismo, trabaja como peroxidasa activa en las células espermátogénicas, protegiéndolas de la rápida división



contra la lesión oxidativa e igualmente actúa como proteína estructural, acumulándose en la cápsula mitocondrial (Garrido y cols. 2004a).



**Fig 6:** Estructura tridimensional de GPx-1 y GPx-4

Las fuentes de RL por las cuales el espermatozoide se ve afectado son principalmente: de los espermatozoides defectuosos y de los leucocitos seminales (generalmente provenientes de infecciones en las glándulas accesorias) (Potts and Pasqualotto. 2003). En teoría una falta de protección del sistema antioxidante contribuiría a hacer a las células más vulnerables a niveles normales de RL y/o la exposición a una producción excesiva de RL podría ser la responsable del OS en la línea germinal masculina. Una exposición prolongada de las células espermáticas a las ROS podría causar peroxidación lipídica de la membrana celular, alterar la estructura de los receptores de proteínas, enzimas y proteínas de transporte; y afectar la fragmentación del ADN espermático (Fraczek and Kurpysz. 2005). Por otra parte los factores ambientales, entre ellos el humo del cigarrillo, inducen OS sistémico,

permitiendo una disminución de vitaminas antioxidantes del plasma seminal y la inducción del daño al ADN espermático (Comhaire y cols. 2000, Fraga y cols. 1996, Moustafa y cols. 2004, Sanocka y cols. 2003) (Fig 7).

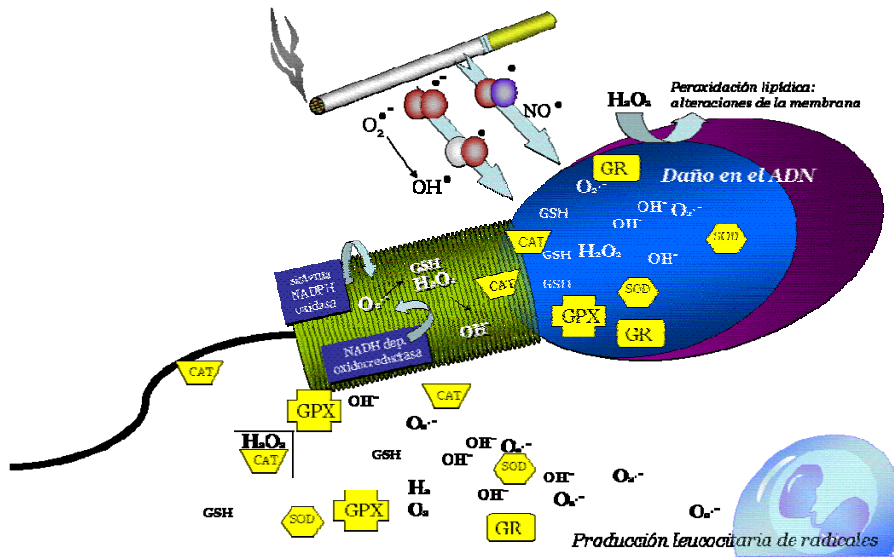


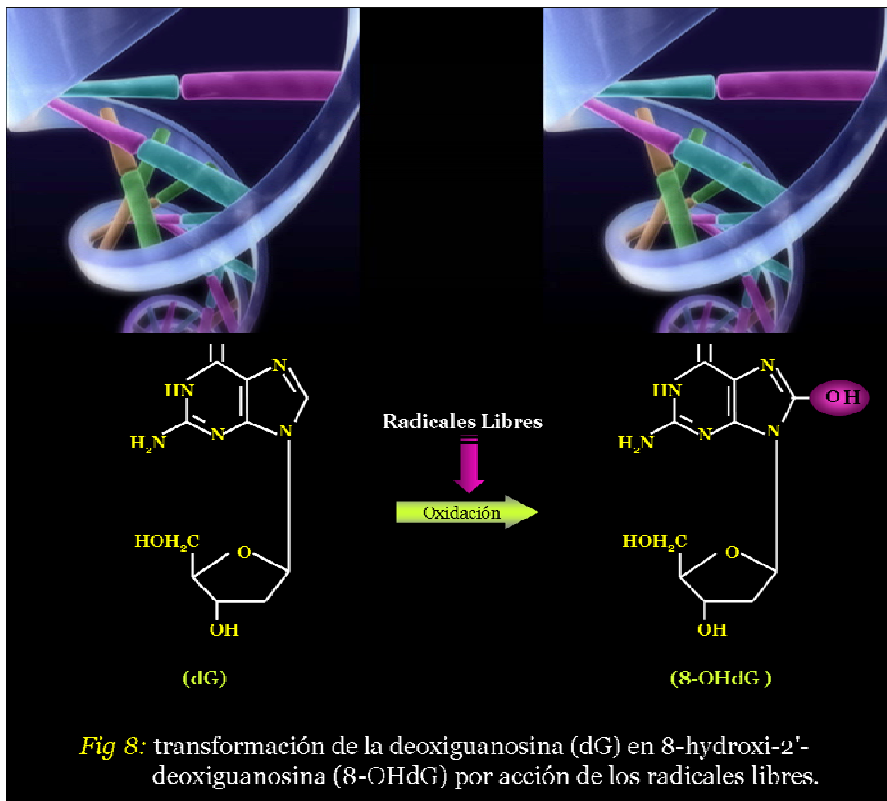
Fig 7: Producción leucocitaria de radicales libres; probable producción por acción del tabaco y alteraciones en el espermatozoide.

#### 1.4.6 Daño oxidativo al ADN (estrés oxidativo):

Numerosas investigaciones han relacionado al tabaco y la infertilidad masculina, sin embargo los mecanismos moleculares exactos son aún desconocidos en la mayoría de los casos (Fraga y cols. 1996). Arabi y col. (2005), concluyen que el cigarrillo induce OS tanto por el incremento en los niveles de oxidantes originados al fumar como por la disminución en los niveles de antioxidantes en el plasma seminal. Así mismo, trabajos realizados en hombres infértiles han demostrado que los fumadores presentan un incremento significativo en la concentración de

ROS en semen comparado con aquellos que no fuman, debido al aumento de la concentración de leucocitos en semen (Saleh y cols. 2002a) y afectando en igual medida al ADN espermático (Potts y cols. 1999). Este daño a nivel del ADN espermático también se ha evidenciado por niveles incrementados de 8-deoxiguanosina (8-oxodG), un marcador de daño oxidativo del ADN (Potts y cols. 1999).

La deoxiguanosina (dG) es uno de los constituyentes de ADN y al oxidarse se transforma en 8-hydroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Meseguer y cols. 2007) (**Fig 8**).



La 8-OHdG es una base modificada por la acción del daño oxidativo, que fisiológicamente puede ser reparada por la 8-Oxoguanina

DNA glicosilasa en mamíferos superiores, incluido humanos; y que ha sido relacionada previamente con la infertilidad (Shen y cols. 1999).

La 8-OHdG es un óptimo marcador biológico de estrés oxidativo, porque responde proporcional y sensiblemente al grado de estrés. El daño oxidativo al ADN, evidenciado por la presencia de 8-OHdG, es indicativo de un número de condiciones que envuelven la generación de radicales libres. Se ha descrito que el daño es observado durante procesos de mutagénesis y carcinogénesis que pueden ser causados además de la actividad metabólica normal, por distintos factores, incluyendo radiaciones y agentes químicos (Meseguer y cols. 2007)

Se ha demostrado que la nicotina, como mayor compuesto del cigarrillo, actúa como un potente agente oxidante sobre la integridad de la membrana espermática (Arabi. 2004). Conjuntamente, a todo nivel, el cigarrillo se ha asociado a un incremento de la peroxidación lipídica y además se ha descrito que en la población sana causa una debilitación en los sistemas antioxidantes (Solak y cols. 2005).

Dado al gran número de hombres fumadores en la población general, y al hecho que el cigarrillo es conocido por ser un agente mutagénico y carcinogénico, así como el efecto deletéreo que tiene sobre los gametos, se pretende evaluar los efectos del tabaco sobre la defensa oxidativa del espermatozoide. Para ello se pretende correlacionar la defensa del espermatozoide al estrés oxidativo, a través de los niveles de glutatión reducido (GSH), expresión de GPx (1 y 4) y GR mediante la reacción en cadena de la polimerasa semi-cuantitativa fluorescente (qf-PCR); y la actividad de ambas enzimas mediante espectrofotometría, y comparar estos marcadores de estrés oxidativo en hombres fumadores y no fumadores. De igual manera se pretende valorar el efecto del tabaco sobre la oxidación del ADN espermático como resultado primario de la acción de los radicales libres sobre éste y como posible causa potencial de la fragmentación del ADN espermático.





## **2. OBJETIVOS**





## 2.1 OBJETIVO GENERAL:

- ✿ Determinar el efecto del tabaco sobre la calidad seminal a través del estudio básico del semen, estudios citogenéticos y moleculares en pacientes que asisten a la consulta de infertilidad.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✿ Determinar el efecto del tabaco sobre la calidad seminal.
- ✿ Determinar el efecto del tabaco sobre la proporción de espermatozoides X e Y, y a partir de ello, el efecto sobre el ratio XY:XX de los embriones analizados en pacientes que asisten a un ciclo de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).
- ✿ Determinar la asociación del tabaco con anomalías cromosómicas en espermatozoides.
- ✿ Determinar el efecto del cigarrillo sobre la fragmentación del ADN en el espermatozoide mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD).
- ✿ Determinar el efecto del tabaco sobre algunas enzimas implicadas en el proceso de óxido-reducción en el espermatozoide para la eliminación de radicales libres.
- ✿ Determinar el efecto del tabaco sobre la oxidación del ADN espermático.



### **3. DISEÑO EXPERIMENTAL**



### **3.1 DISEÑO:**

Proyecto de investigación de cohortes, parte retrospectivo (evaluación de la calidad seminal según el consumo de tabaco en pacientes infértiles) y parte prospectivo (todos los demás análisis requeridos para alcanzar el resto de objetivos del presente trabajo) de tipo ciego; en el cual se realizó una selección controlada de pacientes, que se distribuyeron en función de la presencia o ausencia del hábito tóxico del tabaco para cada uno de los objetivos a estudiar.

### **3.2 LUGARES DE EJECUCIÓN:**

- Laboratorio de andrología y banco de semen del IUIVI-Valencia.
- Laboratorio de FISH del IUIVI-Valencia.
- Laboratorio de DGP del IUIVI-Valencia.
- Unidad de citómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe



## **4. HIPÓTESIS**





Basándonos en trabajos y conocimientos previos acerca de la infertilidad masculina y el tabaco como uno de los factores externos que pueden influir en ella, nos hemos planteado varias hipótesis de partida en el presente trabajo:

Por un lado, algunos autores han descrito que el tabaco afecta la calidad seminal, por tanto nuestra hipótesis en relación a ello, es que ésta debería verse afectada en los hombres fumadores con respecto a los no fumadores. Por otro lado, en referencias previas hemos evidenciado una alteración en el sex ratio de los recién nacidos vivos procedentes de hombres fumadores a favor de las niñas con respecto a los hombres no fumadores; en consecuencia, nos hemos planteado que probablemente esta misma alteración debería percibirse a nivel de espermatozoides y embriones.

Así mismo, debido al gran número de sustancias químicas presentes en el cigarrillo y los daños conocidos, podría haber mayor número de anomalías cromosómicas en espermatozoides procedentes de hombres fumadores en comparación con aquéllos que no lo son.

De manera similar ha sido descrito que, una de las causas potenciales de la fragmentación del ADN en el espermatozoide es la exposición a toxinas ambientales, una de ellas podría ser la exposición al cigarrillo, por lo tanto en los hombres fumadores debería percibirse una mayor fragmentación en el ADN de los espermatozoides que en aquellos no fumadores.

Sustentándonos en algunas bases moleculares, en las que la medición de los antioxidantes y oxidantes pudieran servir para evaluar la infertilidad humana, las especies reactivas del oxígeno (ROS) tienen la capacidad de alterar reversible o irreversiblemente la función celular, modificando la bioquímica y la fisiología del espermatozoide. Otra de las hipótesis que nos hemos planteado es que el cigarrillo al generar ROS pudiera originar un nivel de estrés oxidativo que altere algunas enzimas

del sistema antioxidante que protege a los espermatozoides del daño producido y posiblemente alterar el ADN espermático, oxidándolo.





## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **5.1 POBLACIÓN:**

La población objeto de estudio son pacientes infértiles que asisten para tratamientos de reproducción asistida a un centro de infertilidad. De ésta, se realizó una selección muestras de semen procedentes de eyaculado, con previo consentimiento de los pacientes, ya que algunos de los análisis realizados son pruebas que no se practican de rutina en los laboratorios.

Inicialmente, se estudió retrospectivamente la calidad seminal de los pacientes que asistieron al laboratorio de andrología entre el período 2003-2006 y se establecieron comparaciones múltiples de acuerdo a sus hábitos tóxicos en el momento del análisis. En este primer estudio no se establecieron criterios de exclusión respecto a los parámetros seminales, ya que fue una evaluación global del efecto del tabaco sobre la población general que consulta por infertilidad; pero sí se establecieron otros criterios de exclusión (no relacionados a las características del semen) descritos posteriormente.

A continuación, se analizaron prospectivamente un grupo de muestras de pacientes que acudieron a un ciclo de DGP a los que también se les realizó un FISH de espermatozoides.

Otro grupo muestral se basó en pacientes que acuden al laboratorio de andrología, a los que se les determinó la fragmentación del ADN espermático; a un grupo distinto de pacientes, se le estudiaron algunas enzimas del sistema glutatión y en otro grupo, la posible oxidación del ADN espermático a causa del tabaco. Todos los análisis se llevaron a cabo sin conocer la procedencia de los grupos a estudiar, es decir, si eran pacientes fumadores o no.

Paralelo a los análisis, se procedió a realizar una encuesta a los pacientes acerca de sus hábitos tóxicos (si fumaban o no y la cantidad) en el momento en el cuál fue realizado el ciclo o la toma de muestra y en

los 3 meses previos al análisis. Posteriormente se estructuraron los grupos según los hábitos y se analizaron los datos.

En los estudios realizados se estipularon algunos criterios de exclusión:

- En todos los estudios prospectivos no se incluyeron en la población a pacientes con características muy patológicas del semen, como oligozoospermia severa, azoospermia ni criptozoospermia. Por un lado, debido a que la mayoría de los experimentos requirieron de un número importante de células (espermatozoides) para realizar las distintas determinaciones; y por otro, ya que en investigaciones previas se ha descrito que sémenes patológicos de pacientes infértiles se han relacionado con anomalías cromosómicas (Rodrigo y cols. 2004), y posiblemente podrían haber alteraciones moleculares en muestras de semen con estas características que conseguirían sesgar el estudio.

- Tanto para el estudio retrospectivo como para los prospectivos, aquellos pacientes que hubieran fumado puros, pipa, o hubiesen consumido drogas o alcohol en los 3 meses previos a la realización del análisis, no fueron incluidos. También éstos fueron excluidos, si tenían historia reciente de fiebre o exposición a gonadotoxinas como son los fármacos utilizados en quimioterapia, los tratamientos de radioterapia, los pesticidas o exposición ocupacional a metales pesados. Además, se investigó acerca de la presencia de varicocele, torsión testicular y cualquier otra alteración en el tracto genito-urinario, para no incluirlos.



## **5.2 MUESTRA:**

A continuación se describirá el grupo muestral utilizado para estudiar cada una de las siguientes relaciones:

### **5.2.1 Calidad seminal y tabaco:**

Se analizaron retrospectivamente 6048 muestras de semen de 6048 pacientes, sin embargo, tras evaluar sus hábitos tóxicos se excluyeron 717 pacientes, de los cuales 552 eran ex fumadores, 10 fumaban puros, 144 eran fumadores esporádicos y 6 consumían drogas. Por lo tanto, para este análisis se incluyeron al final 5331 muestras de semen para determinar volumen, concentración, movilidad progresiva y morfología espermática. Tras evaluar sus hábitos tóxicos, se establecieron tres grupos según el consumo diario de cigarrillo en los hombres: no fumadores (n = 3201), fumadores moderados: de 1-19 cigarrillos por día (n = 942) y hombres muy fumadores: más de 19 cigarrillos por día (n = 1188).

### **5.2.2 Sex ratio (espermatozoides y embriones) y tabaco:**

Se incluyeron prospectivamente, 56 parejas de nuestro programa de DGP. La calidad seminal de las muestras utilizadas en el ciclo fue óptima para realizar el ICSI (procedimiento utilizado en todos nuestros ciclos de DGP), no se incluyeron pacientes con cripto ni azoospermia. Las indicaciones de la mayoría de las parejas que fueron incluidas en el estudio fueron: aborto recurrente y fallo de implantación, no se incluyó ninguna indicación por factor masculino. Así mismo, el análisis de FISH de espermatozoides fue realizado en las muestras de semen de todos los varones de la pareja para determinar la proporción de espermatozoides X e Y en las mismas. La media de la edad de las mujeres fue  $33,7 \pm 3,5$  años y la de los varones  $36,2 \pm 5,7$  años. Tras realizar la encuesta, se establecieron tres grupos según el consumo

diario de cigarrillo en los hombres: no fumadores ( $n = 31$ ), fumadores moderados: de 1-19 cigarrillos por día ( $n = 10$ ) y hombres muy fumadores: más de 19 cigarrillos por día ( $n = 15$ ). Además, las mujeres también se clasificaron en tres grupos similares según sus hábitos de fumar para así separar el efecto del tabaco en cada miembro de la pareja sobre el ratio XY:XX en los embriones de día 3 de desarrollo.

Por otro lado, para estudiar el sex ratio de los embriones, se analizaron prospectivamente 372 embriones procedentes de las mismas 56 parejas, a los que se realizó un FISH a 1 ó 2 blastómeras de cada embrión, analizando los cromosomas sexuales (X e Y), para determinar el sexo de los mismos. Posteriormente, se establecieron tres grupos según el consumo diario de cigarrillo en los hombres: no fumadores ( $n = 31$ ), fumadores moderados: de 1-19 cigarrillos por día ( $n = 10$ ) y hombres muy fumadores: más de 19 cigarrillos por día ( $n = 15$ ).

Posterior a los análisis realizados para alcanzar este objetivo específico, y debido a los resultados obtenidos, también se realizó prospectivamente un FISH de espermatozoides en 8 muestras de semen de donantes para establecer un grupo control (es importante señalar que en este grupo la calidad seminal fue óptima): 4 muestras procedentes de donantes muy fumadores ( $\geq 20$  cig/día) y 4 de no fumadores. Cada una de ellas fueron distribuidas en dos alícuotas, de las cuales una fue fijada directamente para el análisis del FISH y otra alícuota de la misma muestra fue procesada por swim-up (Garrido *y cols.*, 2004) y posteriormente la fracción capacitada fue fijada para realizar otro FISH (en cada una de las dos alícuotas de cada muestras se evaluaron entre 5000 y 10000 espermatozoides para tener un resultado significativo como grupo control).

### **5.2.3 Anomalías cromosómicas de espermatozoides y tabaco:**

Se estudiaron prospectivamente 56 muestras de semen de los 56 pacientes incluidos en el programa de DGP (los mismos estudiados anteriormente) y se les realizó un FISH de espermatozoides para estudio de aneuploidías, para así determinar anomalías cromosómicas para los cromosomas X, Y, 18, 13 y 21.

Con el fin de determinar anomalías para los cromosomas 18, X e Y, se analizaron un total de 126.231 espermatozoides; y para los cromosomas 13 y 21, 113.456 espermatozoides. Se establecieron tres grupos según el consumo diario de cigarrillo en los hombres: no fumadores (n = 31), fumadores moderados: de 1-19 cigarrillos por día (n= 10) y hombres muy fumadores: más de 19 cigarrillos por día (n = 15).

### **5.2.4 Fragmentación del ADN espermático y tabaco:**

Para realizar el estudio prospectivo de la fragmentación del ADN, se obtuvieron muestras de semen de los maridos de parejas que asisten al IVI para un tratamiento de infertilidad. Un total de 99 hombres proporcionaron 99 muestras de semen para ser analizadas; no se incluyeron muestras de pacientes con criptozoospermia ni azoospermia. El rango de edad fue de 26 a 49 años, con una media de 36.

Igualmente, se estipularon tres grupos según el consumo diario de cigarrillo en los varones: no fumadores (n= 51), fumadores moderados: de 1-19 cigarrillos por día (n= 21) y varones muy fumadores: más de 19 cigarrillos por día (n= 27).

### **5.2.5 Defensa oxidativa (sistema glutatión) y tabaco:**

De carácter prospectivo, se recolectaron 64 muestras de semen de 64 hombres infértiles, las cuales se distribuyeron en 2 grupos para determinar: por un lado la expresión enzimática de ARNm de la glutatión

peroxidasa (n=35; [no fumadores: n=20/ fumadores: n=15]), específicamente las isoformas GPx-1, GPx-4 y la glutatión reductasa (GR) mediante extracción de ARN y transcripción reversa semi-cuantitativa fluorescente por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); y por otro lado, la actividad de dichas enzimas así como también la concentración de glutatión celular (GSH) (n=29; [no fumadores: n=14/ fumadores: n=15]) mediante espectrofotometría en reacciones controladas.

#### **5.2.6 Daño oxidativo del ADN espermático:**

Se recolectaron prospectivamente 55 muestras de 55 hombres infértiles. Se evaluó la formación de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), uno de los mayores productos oxidativos del ADN espermático mediante el test de Oxy-DNA en alícuotas de semen en fresco y procesadas por swim-up. Posteriormente, las señales se cuantificaron por citometría de flujo. De manera similar a los estudios anteriores, se establecieron 2 grupos de acuerdo al consumo de cigarrillos: no fumadores (n=30) y fumadores (n=25).

### **5.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:**

#### **5.3.1 ANÁLISIS BÁSICO DE SEMEN:**

##### **- Recogida de la muestra**

Los pacientes reciben unas instrucciones simples y fáciles de comprender para la recogida de la muestra y su traslado al laboratorio.

La muestra de semen se obtiene por masturbación y debe llegar al laboratorio para su procesamiento lo antes posible, sin esperar a que transcurran más de 45-60 minutos desde su recolección hasta su procesamiento.

- **Examen macroscópico**



- ***Licuefacción y Viscosidad***

Al ser recogida la muestra, ésta presenta un estado de coagulación, y necesita licuarse para proceder a su estudio. Una muestra de semen se considera normal cuando se licua en aproximadamente 20-30 minutos a temperatura ambiente tras su recogida (no se debe evaluar la concentración y movilidad de los espermatozoides en la muestra hasta que este proceso no haya finalizado).

Es muy importante no confundir licuefacción con viscosidad. La viscosidad hace referencia a la fluidez de toda la muestra, pudiendo ésta ser normal aunque la licuefacción sea incompleta.

- ***Aspecto***

La muestra debe ser examinada inmediatamente después de la licuefacción, sin dejar que transcurra más de una hora desde su obtención hasta su examen.

El aspecto del eyaculado se determina en función a su color, opacidad/transparencia, y la presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El semen humano es normalmente un fluido homogéneo opalescente-blanquecino-grisáceo. Si la muestra está contaminada con sangre (hematospermia) presenta un color rosáceo, siendo más intenso cuanto mayor sea la contaminación con sangre. Una coloración del semen más amarilla se puede relacionar con contaminación de éste por orina.

- ***Volumen***

El volumen del eyaculado se mide, tras su licuefacción, en un tubo graduado que no contenga plásticos tóxicos. Se debe utilizar un

material estéril. Los valores normales están entre 2-6 ml, cualquier medida fuera de estos valores son considerados anormales: por debajo (hipospermia) y por arriba (hiperespermia).

- **pH**

El pH de la muestra se mide normalmente con tiras de pH (ColorpHast de Merck 6,5-10,0). El pH de la muestra de semen normal está en un rango de 7,2 a 8,2.

- **Examen microscópico**

Durante el estudio microscópico inicial de la muestra de semen se evalúa la concentración, movilidad, aglutinación y morfología de los espermatozoides, así como la presencia de otros elementos celulares, como leucocitos o células germinales inmaduras.



Aunque este estudio se puede hacer en un microscopio de luz normal, nosotros hemos utilizado un microscopio con contraste de fase para los análisis de muestras sin teñir (recomendado por la OMS) (Meseguer y cols. 2004).

- **Preparación de la muestra**

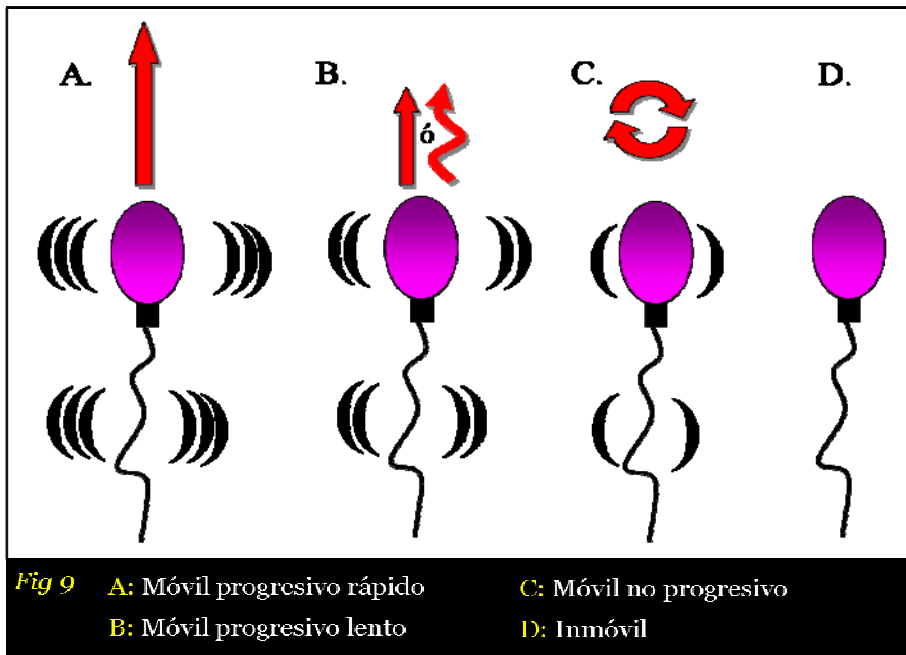
Una gota de 10  $\mu$ l de muestra bien mezclada y licuada se coloca en una Cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). Esto nos da una preparación con una profundidad ideal para realizar el análisis. Este debe comenzar inmediatamente, tan pronto como la muestra se ha estabilizado. La preparación se examinará a un aumento de 20x para analizar la movilidad y concentración espermática.

- **Movilidad**

El primer aspecto a analizar en la preparación es la movilidad de los espermatozoides, la cual debe ser estudiada lo antes posible.

El ensayo de la movilidad se hace solamente de los espermatozoides libres y nunca de los que estén agregados entre sí, o a otras células. Se lleva a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos seleccionados al azar y con un objetivo de 20x en la Cámara Makler. Se cuentan al menos 100 espermatozoides. Primero se deben contar los espermatozoides móviles progresivos del campo o de un área determinada, y a continuación se observan los móviles no progresivos y los inmóviles del mismo campo o área.

Existen cuatro categorías de espermatozoides con respecto a la movilidad que presenten (**Fig 9**):



A= Móviles progresivos rápidos: se desplazan de forma rectilínea y rápida

B= Móviles progresivos lentos: se desplazan más lentamente, de forma rectilínea o en curvas.

C= Móviles no progresivos: se mueven pero no cambian de posición, giran sobre su mismo eje.

D= Inmóviles: no se mueven.

El resultado de la movilidad se presenta como el porcentaje de espermatozoides a, b, c y d.

Se hace necesario destacar que la valoración de los espermatozoides de tipo "A" es muy subjetiva ya que se incluye en este grupo aquellos espermatozoides con una movilidad muy rápida y totalmente rectilínea. La velocidad del espermatozoide incluido en este grupo muchas veces escapa del ojo del analista; por lo tanto, en nuestra rutina de laboratorio (por la cual se rigieron los análisis en el presente trabajo) valoramos la movilidad "A+B". Esta sumatoria termina siendo la realmente importante en el estudio de la movilidad espermática ya que obedece a los espermatozoides progresivos en la muestra analizada.

- ***Aglutinación***

Se considera que hay aglutinación cuando espermatozoides móviles están unidos entre si. No se considerará cuando los espermatozoides están inmóviles o unidos a células.

La búsqueda de aglutinación se hace con aumento de 10X, observando al menos 10 campos. Si se observan grupos de espermatozoides se deberán analizar a 40X, con el fin de discriminar entre aglutinación y agregación.



- **Concentración**

La determinación exacta de la concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro de semen) y de su cantidad total en el eyaculado (millones de espermatozoides por eyaculado) es muy importante, siendo estos parámetros de vital importancia para evaluar la calidad de un eyaculado.

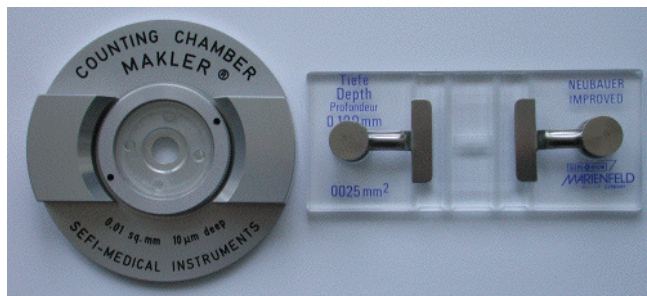
Los valores normales deben estar por encima de 20 millones/ml. Si el valor se encuentra por debajo, la muestra se clasifica según el número de espermatozoides de la siguiente manera:

- Oligozoospermia moderada: entre 10 y 20 millones/ml
- Oligozoospermia severa: entre 0,1 y 10 millones/ml
- Criptozoospermia: menos de 0,1 millones/ml
- Azoospermia: no existen espermatozoides en el eyaculado

El método más exacto para determinar la concentración espermática en el laboratorio es por medio de diluciones volumétricas y hemocitometría. Para ello se diluye la muestra de semen 1 en 19 con un diluyente que en 1000 ml de agua destilada contiene 50g de NaHCO<sub>3</sub>, 10 ml de 36-40% de solución de formaldehído y 0,25 gr de *trypan blue*. La muestra diluida se mezcla enérgicamente y se colocan 10-20 µl en una cámara de Neubauer (**Fig 10**), donde una vez las células hayan sedimentado, se realiza el recuento.

En el presente estudio, para determinar la concentración espermática, se ha utilizado la Cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) (**Fig 10**). Esta cámara esta diseñada específicamente para el recuento de espermatozoides y sirve tanto para el estudio de la movilidad como de la concentración en muestras mayores de 1 millón espermatozoides/ml ya que se utiliza la muestra en fresco y sin diluir. En aquellas muestras donde observamos 1 o ningún espermatozoide en la cámara Mackler, se procedió a utilizar la cámara de Neubauer, colocando en la misma una gota de semen sin diluir entre la cámara y el

cubreobjeto, y se contaron los espermatozoides que se encuentran en el gran cuadrado central (con sus 25 cuadros pequeños) y se multiplicó por 10.000 (sin añadir el factor de dilución porque se utiliza la muestra sin diluir), así, el resultado obtenido correspondería a millones de espermatozoides/ml de muestra. Sin embargo en este trabajo, las muestras que presentaron esta característica (< 1 millón espermatozoides/ml) fueron excluidas para nuestros estudios (explicado en el apartado: “criterios de inclusión”).



**Fig 10:** Cámara Mackler (izquierda). Cámara Neubauer (derecha)

- **Morfología**

El estudio de las características morfológicas de los espermatozoides es tan importante para completar la evaluación de una muestra de semen como el análisis de su movilidad y concentración.

La morfología espermática se estudia en extensiones teñidas. La tinción de Papanicolaou es el método recomendado por la OMS, el cual permite la tinción de las regiones acrosómicas y post-acrosómicas de la cabeza, la gota citoplasmática, la pieza media y la cola. En algunos laboratorios se utilizan otros métodos de tinción rápida como el Diff-Quick (Dade Diagnosis, Miami EE.UU) o la tinción de Hemacolor (Merck), esta última utilizada en este estudio. Protocolo:

Se prepara una extensión con 5µl de semen y se deja secar; seguidamente se pasa durante 5 segundos por cada uno de los tres reactivos de la tinción:

- a) Solución fijadora: metanol
- b) Solución de eosina
- c) Solución de Thiazina



Se lava por último en agua destilada para quitar los restos de colorante y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se observa con objetivo de 100X para proceder a la clasificación de los espermatozoides según el criterio estricto de Kruger. Se cuentan 100 espermatozoides y el valor se expresa en porcentajes, evaluando los espermatozoides normales, espermatozoides con anomalías de cabeza, pieza media y cola (**Fig 11**). Según Kruger, una muestra se considera teratozoospermica cuando posee más del 14% de formas anormales.



**Fig 11:** Representación de la morfología espermática normal y anormal

## **5.4 RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA**

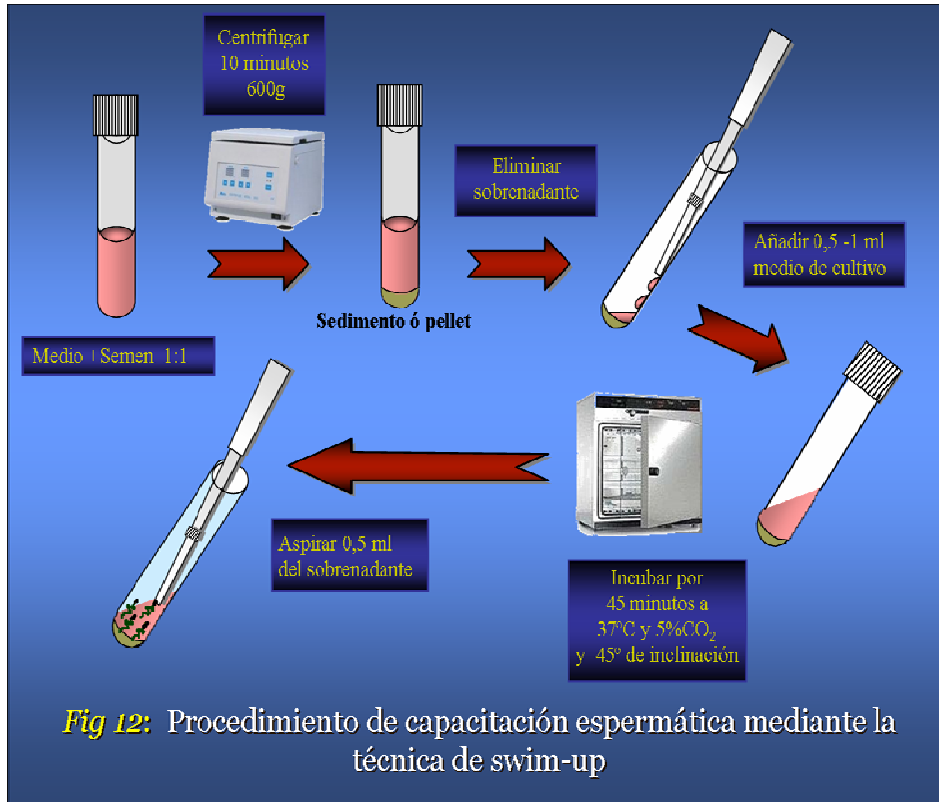
Mediante la recuperación espermática (ó capacitación), se elimina el plasma seminal del eyaculado y se seleccionan los espermatozoides con mejor movilidad. Son muchas las técnicas empleadas a tal efecto basadas en las más diversas hipótesis de conducta de los espermatozoides frente a ellas (Meseguer y cols. 2003). La utilizada más frecuentemente y por tanto en este estudio, es la técnica de swim-up.

### **5.4.1 Técnica de “SWIM-UP”**

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los espermatozoides con movilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado, también denominado “capacitación espermática”. El protocolo a seguir es el siguiente (**Fig 12**):

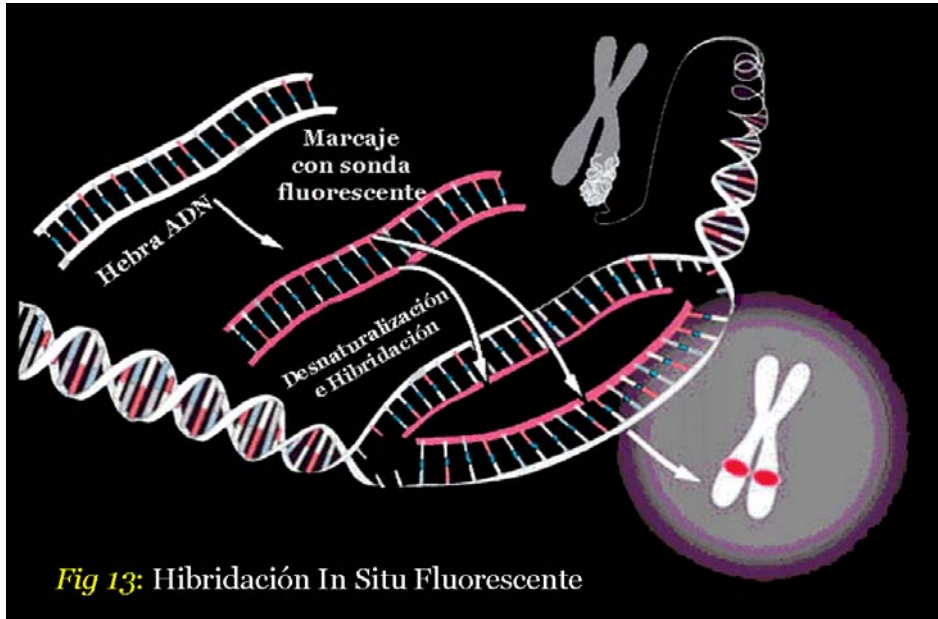
Se coloca el eyaculado en un tubo Falcon ® (Becton Dickinson, USA) de 13 ml y se añade medio HTF/HSA 5% (IVI Barcelona) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) en proporción 1:2 ó 1:3; se centrifuga 10 minutos a 600g y se decanta con cuidado. Una vez decantado, se le añade al pellet o sedimento (de aquí en adelante se seguirá utilizando la palabra “pellet” para referirnos al sedimento espermático) entre 0,5-1 ml de medio, dejándolo resbalar cuidadosamente por las paredes.

Seguidamente se coloca el tubo en el incubador con 45° de inclinación durante 45 minutos a 37°C; allí los espermatozoides móviles migran desde el pellet hacia el medio de cultivo. Por último, pasado ese tiempo, se aspira cuidadosamente el sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles que han ascendido.



### 5.5 HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH):

La hibridación in situ fluorescente (FISH) se ha utilizado ampliamente en los últimos años en el campo de la citogenética molecular, para el estudio tanto de metafases como de núcleos interfásicos. Esta técnica utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma (**Fig 13**). De este modo, se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de una célula.



### 5.5.1 FISH de espermatozoides:

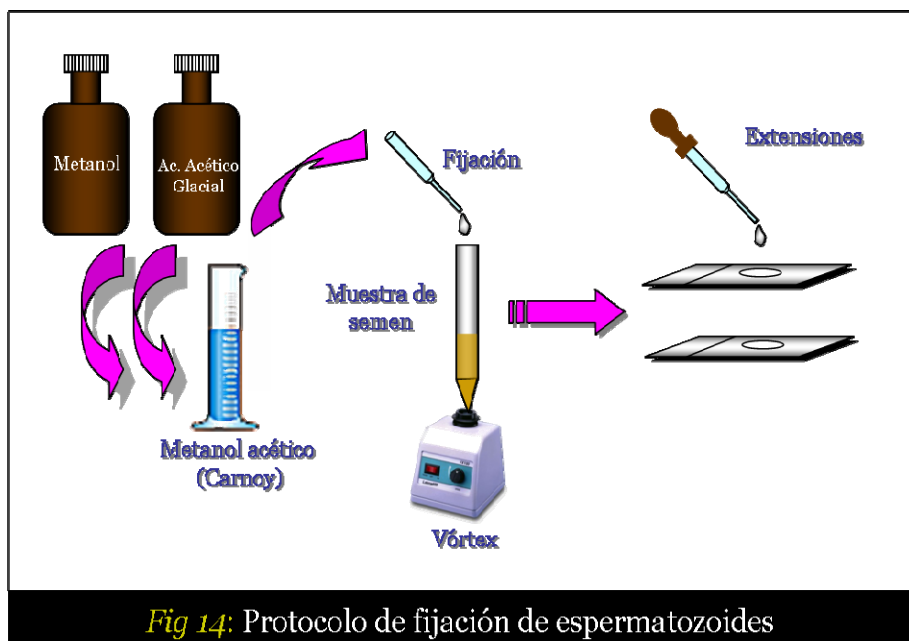
El FISH de espermatozoides consiste en marcar cromosomas específicos en el núcleo de los espermatozoides en estadio de interfase previamente fijados y extendidos en una lámina portaobjetos y posteriormente descondensados y desnaturalizados, para poder determinar si presentan o no una dotación cromosómica correcta. La valoración de las señales de hibridación se realiza bajo microscopio de fluorescencia utilizando criterios estrictos. Se evalúa la incidencia de espermatozoides haploides, diploides y disómicos en cada una de las muestras. En la actualidad se ha introducido como una prueba diagnóstica más en el estudio de la infertilidad en el varón.

#### **- Fijación de las muestras de eyaculado (Fig 14):**

Se deposita la muestra en un tubo cónico y se lava con 5 ml de medio de cultivo para espermatozoides (HTF/HSA) por cada 2 ml de

muestra y se centrifuga 10 minutos a 600g. Seguidamente, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet con la solución de fijación compuesta por metanol y ácido acético glacial (Carnoy) en proporción 3:1, añadiéndolo gota a gota lentamente y agitando con un agitador vórtex para evitar la formación de grumos, hasta un volumen final de 3-4 ml de solución de fijación y se procede a centrifugar por 5 minutos a 600g. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con el fijador del mismo modo que antes y volver a centrifugar por 5 minutos a 600g. Nuevamente se descarta el sobrenadante y se añade gota a gota el fijador hasta conseguir una solución semitransparente.

Extender los espermatozoides en portaobjetos previamente desengrasados, dejando caer una gota de la dilución en el centro del portaobjetos desde una altura de 20-25 cm. Almacenar los portaobjetos a -20°C hasta la hibridación.



*Fig 14.* Protocolo de fijación de espermatozoides

**- Hibridación con sondas de ADN fluorescentes**

Es importante mencionar que el reducido tamaño de la cabeza de los espermatozoides y la compactación de la cromatina del núcleo por la formación de puentes disulfuro entre protaminas, limita el acceso de las sondas de ADN a su secuencia diana. Por ello, muchos protocolos de FISH de espermatozoides incluyen un tratamiento previo de descondensación del núcleo con agentes reductores de puentes disulfuro (Vidal y cols. 1993, Wyrobek y cols. 1990).

• **Protocolo de hibridación (Fig 15):**

Se marca con un lápiz de diamante un área de aproximadamente 15x15 mm que recoja el centro de la gota donde tenemos extendidos los espermatozoides en el portaobjetos; luego se realiza un lavado de 5 minutos en 2xSSC (Citrato Sódico Salino (SSC, solución 20X, Sigma) a temperatura ambiente, para posteriormente deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%) (Merck, Darmstadt, Alemania), durante 2 minutos en cada alcohol, y se dejan secar. El protocolo consta de los siguientes procesos:

a) Descondensación:

Se incuban las muestras durante 5-12 minutos (dependiendo de los cromosomas a estudiar y la sonda a utilizar) a 37°C en una cubeta coplin con DTT (Ditiotreitol 5 mM, Roche Farma, S.A) atemperado previamente en estufa a 37°C durante 30'. A continuación, se realiza un lavado de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente, para luego deshidratar las muestras en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 90%, 100%), durante 2 minutos en cada alcohol, y se dejan secar a temperatura ambiente.



*b) Desnaturalización:*

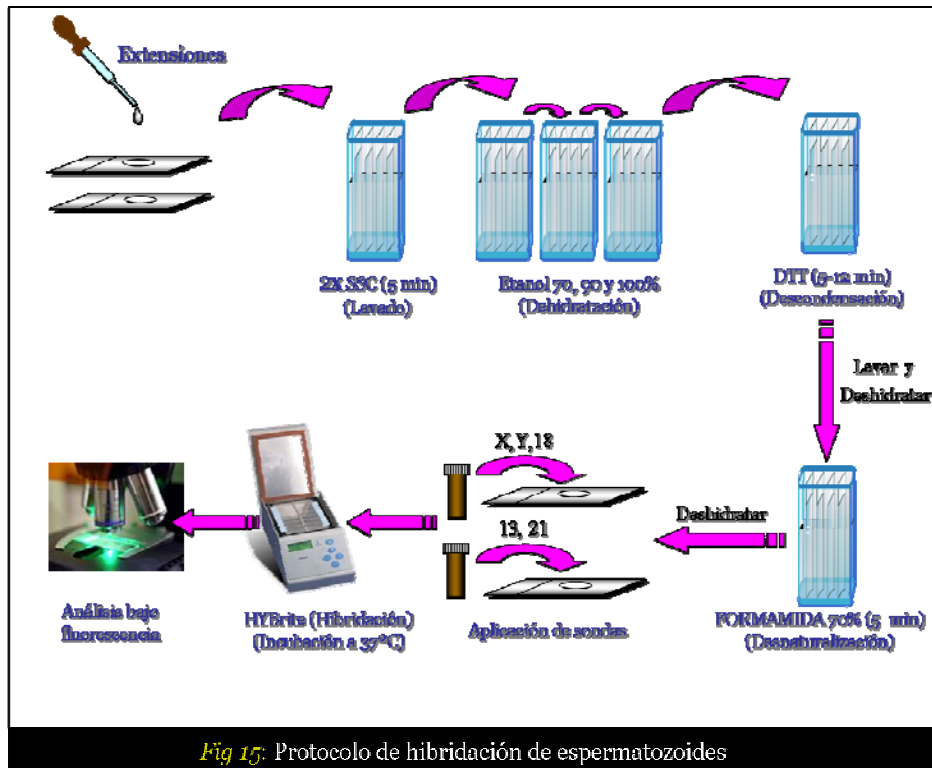
Se incuban las muestras durante 5 minutos a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en Formamida al 70% (Roche Farma, S.A) atemperada previamente en un baño de agua a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, para luego deshidratarlas en una serie creciente de alcoholes (etanol 70%, 85%, 100%), durante 1 minuto en cada alcohol, y se dejan secar a temperatura ambiente.

*c) Hibridación:*

Se aplican 5  $\mu\text{l}$  de la sonda en un cubreobjetos de 15x15 mm, posteriormente se depositan en el portaobjetos sobre el área que se marcó con el lápiz de diamante al inicio del procedimiento, en donde se encuentran los espermatozoides extendidos y fijados. Para finalizar, se sella con cola. Sondas a utilizar: 13, 18, 21, X e Y (Vysis Inc., USA). Seguidamente se dejan incubando las muestras en un Hybrite (Vysis Inc., USA).

*d) Detección:*

Se elimina la cola y se retira el cubreobjetos deslizándolo suavemente. Posteriormente, se lavan las muestras 1 minuto y medio en 0,4x SSC (previamente atemperado en un baño térmico a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante al menos 30 minutos) y luego 30 segundos en 2xSSC/NP-40 (Nonidet P-40, Vysis Inc., USA) a temperatura ambiente. Se dejan secar y se aplican 5  $\mu\text{l}$  de una contratinción de DAPI II (Vysis Inc., USA); colocar un cubreobjetos, sellar con esmalte de uñas y mirar al microscopio de fluorescencia.



*Fig 15:* Protocolo de hibridación de espermatozoides

- **Interpretación de las señales de hibridación:**

La visualización de las señales se realiza con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados para los haptenos utilizados. Debido a la baja tasa de anomalías cromosómicas que suelen presentar los espermatozoides para un determinado cromosoma, se analiza un número elevado de espermatozoides por paciente (mínimo de 2000) y un número aún más elevado en el caso de pacientes control (mínimo 10000). Cada uno de los espermatozoides analizados se evalúa como (**Fig. 16a y 16b**):

- Haploide normal: si presenta una señal única para cada cromosoma analizado.

- Disómico: si presenta dos señales para un cromosoma concreto y una señal única para el resto de cromosomas analizados.
- Diploide: si presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados.

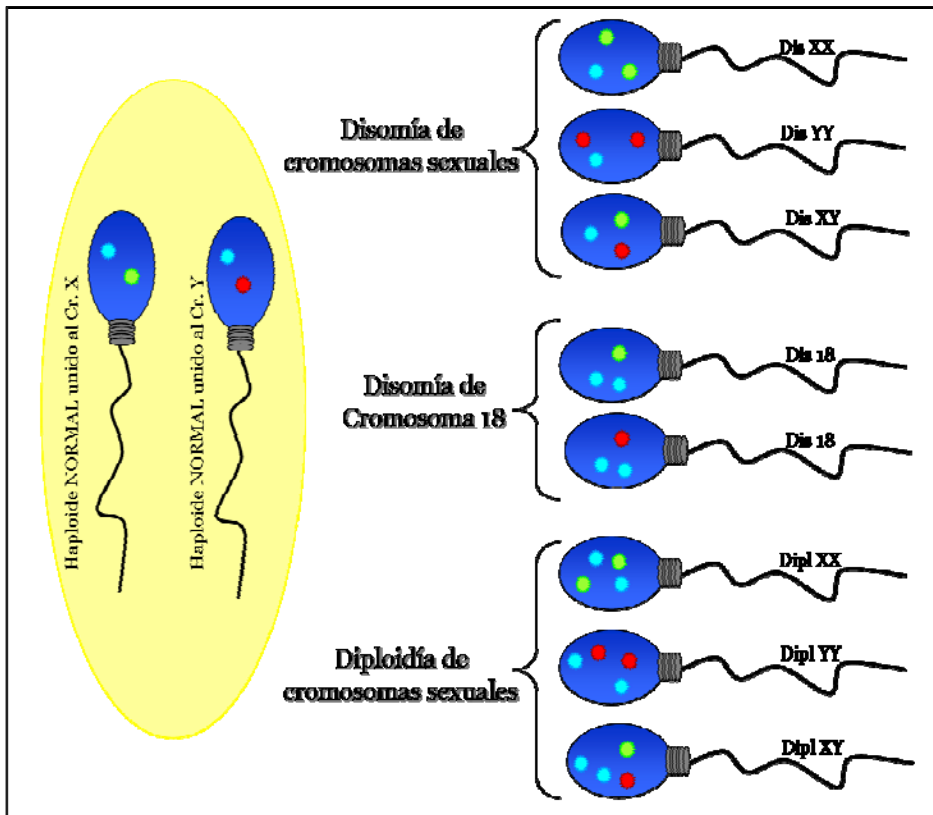
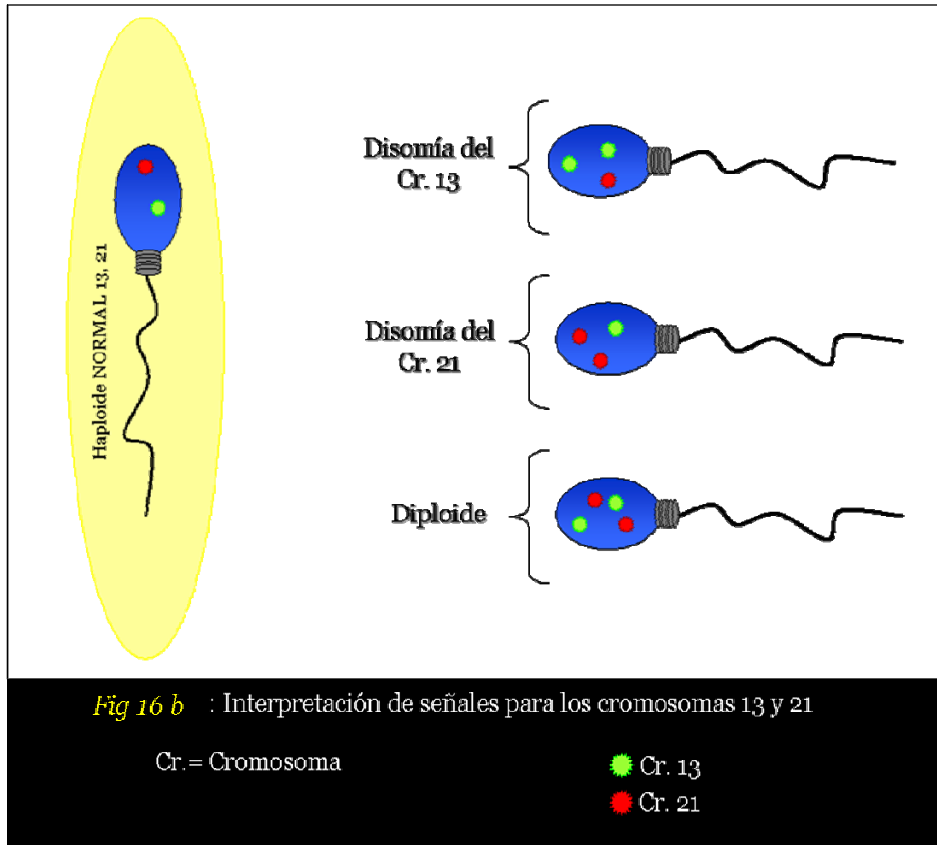


Fig 16 a.: Interpretación de señales para los cromosomas X, Y, 18

Cr.= Cromosoma  
 Dis.= Disomía  
 Dipl.= Diploidía

● Cr. 18  
 ● Cr. X  
 ● Cr. Y



La ausencia de señal para un cromosoma puede ser debida a una nulisomía o a un fallo de hibridación. Por la dificultad para diferenciar entre ambas posibilidades, se considera la incidencia de nulisomías como la misma que de disomías (Egozcue y cols. 1997).

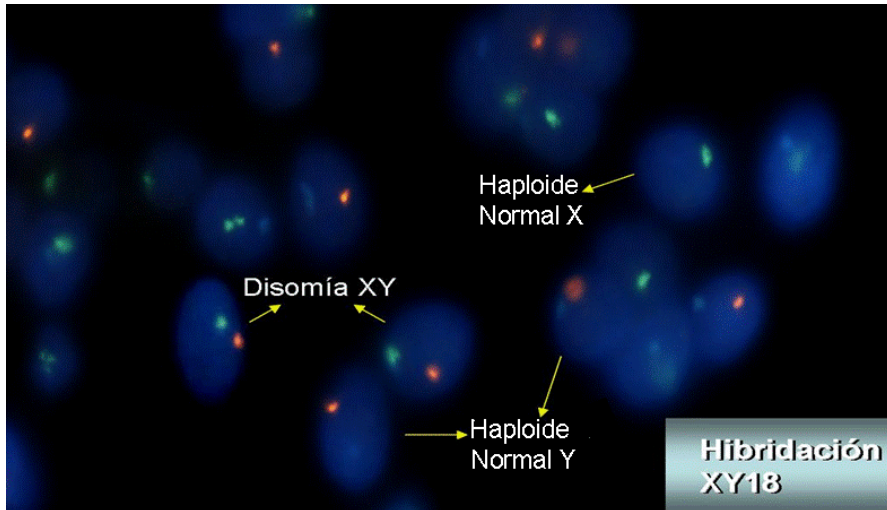
La evaluación de los espermatozoides se realiza siguiendo los criterios estrictos descritos por Blanco y cols. (1996), con el fin de reducir el margen de error y hacer reproducible la técnica por diferentes observadores. Estos criterios se resumen en tres (**Fig 17 y 18**):

- Evaluar espermatozoides con contorno definido y no superpuestos con otros.
- Evaluar señales de hibridación localizadas claramente en el interior del núcleo.

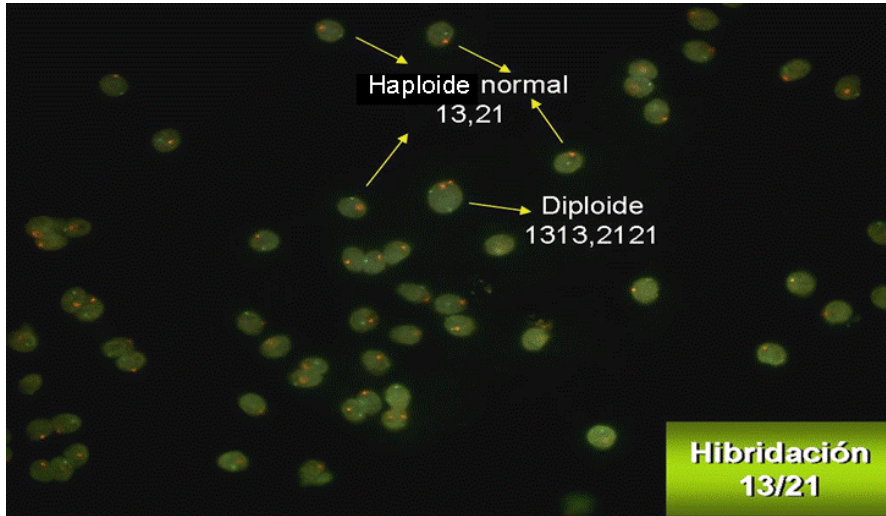
- En casos de disomía y diploidía ambas señales deben tener la misma intensidad y estar separadas entre sí por una distancia mínima equivalente al diámetro de cada señal.

Los resultados obtenidos tras el estudio de FISH de espermatozoides se comparan con los valores de referencia de muestras obtenidas de una población control de donantes fértiles normozoospermicos. La tasa total de espermatozoides anormales en una muestra se calcula como la suma de la tasa de espermatozoides aneuploides (disómicos y nulisómicos) para los 23 cromosomas y la tasa de espermatozoides diploides.

A nivel clínico, consideramos que un resultado de FISH es anormal cuando se observa un incremento estadísticamente significativo de anomalías para los cromosomas analizados al compararlos con los de la población control.



**Fig 17:** Evaluación de la hibridación para los cromosomas X, Y y 18 bajo microscopio de fluorescencia.



**Fig 18:** Evaluación de la hibridación para los cromosomas 13 y 21 bajo microscopio de fluorescencia.

### 5.6 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP):

Esta técnica pretende comprobar que la dotación cromosómica de los embriones es normal y no se han producido aberraciones cromosómicas durante su desarrollo como se han descrito en un elevado porcentaje en la población embrionaria de los ciclos de reproducción asistida (Rubio y cols. 2003). El DGP se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico. La biopsia embrionaria, se realiza en el tercer día de desarrollo, a continuación se analizan las células obtenidas y el resultado del estudio genético se obtiene en un plazo máximo de 48 horas, para luego hacer la transferencia en el día 5 de desarrollo embrionario.

En los embriones se pueden presentar las siguientes anomalías: alteraciones genómicas (triploidía, haploidía), anomalías numéricas de cromosomas individuales (trisomías, monosomías), anomalías

cromosómicas estructurales, mutaciones puntuales que afectan a la función de determinados genes.

En principio, los estudios de citogenética clásica mediante el análisis de cromosomas metafásicos, nos permitirían detectar una parte importante de estas alteraciones (excepto las alteraciones estructurales que comprendan pequeñas regiones de la secuencia de ADN y las mutaciones puntuales). Esta técnica utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma.

En primer lugar, la pareja debe someterse a un tratamiento de FIV, en el que se realiza una estimulación ovárica y se recuperan los ovocitos mediante una punción transvaginal guiada con ecografía. Los ovocitos pueden ser inseminados (FIV convencional), aunque con mayor frecuencia se realiza microinyección intracitoplasmática (ICSI), ya que facilita los pasos posteriores de biopsia embrionaria y garantiza una tasa de fecundación elevada. A las 18-20 horas se valora la presencia de fecundación y los embriones se mantienen en cultivo hasta el momento de la biopsia (72 horas después de la aspiración).

### **5.6.1 Biopsia embrionaria**



La biopsia se realiza bajo microscopio invertido (Diaphot 300, Nikon, Japón), utilizando el objetivo de 40X con óptica de Hoffmann, 2 micropipetas adaptadas al micromanipulador (la pipeta de sujeción y la pipeta de aspiración del blastómero) y un sistema láser (OCTAX Laser Shot™ system) para realizar un orificio en la zona pelúcida (ZP) del embrión. Tras la realización del orificio en la ZP se aspiran uno o dos blastómeros y se liberan junto al embrión. Concluida la biopsia, se retiran los embriones de la placa de biopsia y se colocan

de nuevo en la placa de cocultivo, mientras que los blastómeros extraídos permanecen en sus microgotas, en la placa de biopsia, hasta el momento de la fijación.

### **5.6.2 Fijación de blastómeros**

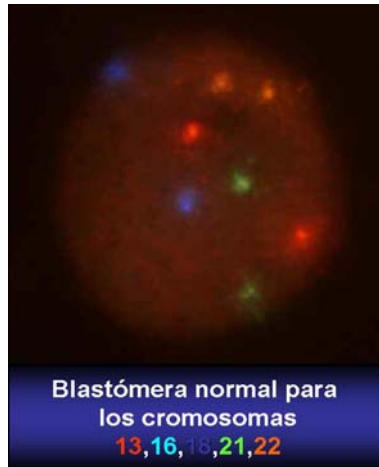
Una vez se ha extraído el blastómero, se procede a la fijación de su núcleo, de modo que se eliminan los restos de citoplasma por completo y se mantiene la integridad y morfología del núcleo. La fijación es un paso decisivo en todo el proceso, ya que la calidad de las extensiones va a condicionar el acceso de las sondas al núcleo y de ello dependerá la eficiencia de hibridación. Existen diferentes métodos de fijación, tomados de la citogenética clásica, el más utilizado es el de Tarkowski en el que se extiende y se fija el núcleo con una solución de Carnoy.

### **5.6.3 FISH de blastómeros**

Los núcleos fijados en los portaobjetos se deshidratan mediante la incubación en una serie creciente de alcoholes (Etanol 70, 85 y 100%). Se realiza la hibridación de los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y (Vysis Inc., Downers Grove, Il) colocando un cubreobjetos con las sondas de ADN sobre los núcleos de los blastómeros fijados. Posteriormente se realiza una desnaturalización conjunta del ADN del núcleo y de la sonda mediante curvas de temperatura en Hybrite (Vysis Inc., USA). Después de los lavados post-hibridación, la valoración (**Fig 19 a, b y c**) se realiza también con microscopio de fluorescencia (OLYMPUS Provis AX-70) equipado con los filtros adecuados (filtros individuales específicos para: FITC, Texas-Red, Gold, Aqua-Blue, Blue, Triple filtro DAPI/Texas-Red/FITC). Se determina la incidencia de



nulisomías, monosomías, trisomías y tetrasomías así como ploidía de los núcleos analizados.



**Fig 19a:** Cada color representa un cromosoma (indicado en la leyenda de la figura con el color respectivo)



**Fig 19b**



**Fig 19c**

Cada color representa un cromosoma (indicado en la leyenda de la figura con el color respectivo)

## 5.7 FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO. PRUEBA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA (SCD)

El SCD (*Halosperm® kit*, INDAS laboratories, España) es una prueba desarrollada recientemente, descrita por Fernández y cols., (2003), basada en el hecho que en espermatozoides con las cadenas de ADN intactas se produce una descompactación de los bucles de ADN, empaquetados en la matriz nuclear tras haber sido expuesto a un tratamiento ácido, seguido a un tratamiento con agentes reductores y detergentes. Esta descompactación produce un halo alrededor de la matriz nuclear que se puede visualizar por microscopía de campo claro usando tinciones habituales como el *Diff-Quick*. Por el contrario, si una de las cadenas de ADN está dañada, no se produce halo, observándose núcleos condensados.

Para el análisis de las muestras se realizó el estudio macro y microscópico del semen según lo descrito anteriormente. Todas las muestras fueron procesadas por swim-up. Posteriormente, el sobrenadante (0,1-0,5ml) fue separado en otro tubo. Luego, para la determinación de la fragmentación del ADN, se tomaron alícuotas (entre 10 y 100  $\mu$ l) con concentraciones entre 5-10 millones de espermatozoides/ml de cada muestra de semen en las alícuotas antes y después del swim-up.

El *kit de SCD* viene provisto de tubos Eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión al 1%, cada uno para procesar una muestra. Estos tubos son colocados en un baño de agua a 90-100°C por 5 min para fundir la agarosa y luego en un baño con agua a 37°C; posteriormente 60  $\mu$ l de las muestras de semen (antes y después de swim-up) se añaden cada una a un tubo Eppendorf y se mezclan con la agarosa fundida. Alícuotas de 50 $\mu$ l de la mezcla se pipetea en un portaobjetos preincubado con agarosa Standard al 0,65% y secados a 80°C, se cubren con un cubreobjetos (24 x 60mm), y se dejan solidificar a 4 °C

por 5 min, para permitir a la agarosa producir un microgel con las células espermáticas incrustadas en ella. Luego los cubreobjetos fueron cuidadosamente separados y los portaobjetos sumergidos inmediatamente en una cubeta horizontalmente con una solución desnaturalizante de ácidos nucleicos (0,08N HCl) durante 7 min a 22°C en oscuridad para generar ADN monocatenario de las zonas de ADN roto. La desnaturalización se detiene y las proteínas son eliminadas al transferir los portas a una cubeta con solución neutralizante y lisante 1 (0,4M Tris; 0,8M DTT; 1% SDS; 50mM EDTA; pH7,5) durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por una incubación en solución neutralizante y lisante 2 (0,4M Tris; 2M NaCl; 1% SDS; pH 7,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Los portas son lavados a continuación en TBE buffer (0,09M Tris-borato; 0,002M EDTA; pH 7,5) durante 2 min., y deshidratados secuencialmente con baños de etanol 70, 90 y 100% (2 min. cada uno) y secados al aire. El núcleo espermático se tiñe con *Diff-Quick* (Baxter Healthcare Corporation, Inc., McGaw, IL) y se cuentan los núcleos no dispersos o dispersos (ADN fragmentado) por microscopia de campo claro hasta un total de 1000 espermatozoide por lámina.

Se han establecido 5 tipos de patrones de SCD (Fernandez y cols. 2003) (**Figura 20**):

a) Células espermáticas de halo grande (CHG): su anchura es similar o más grande que el diámetro menor del nucleoide.

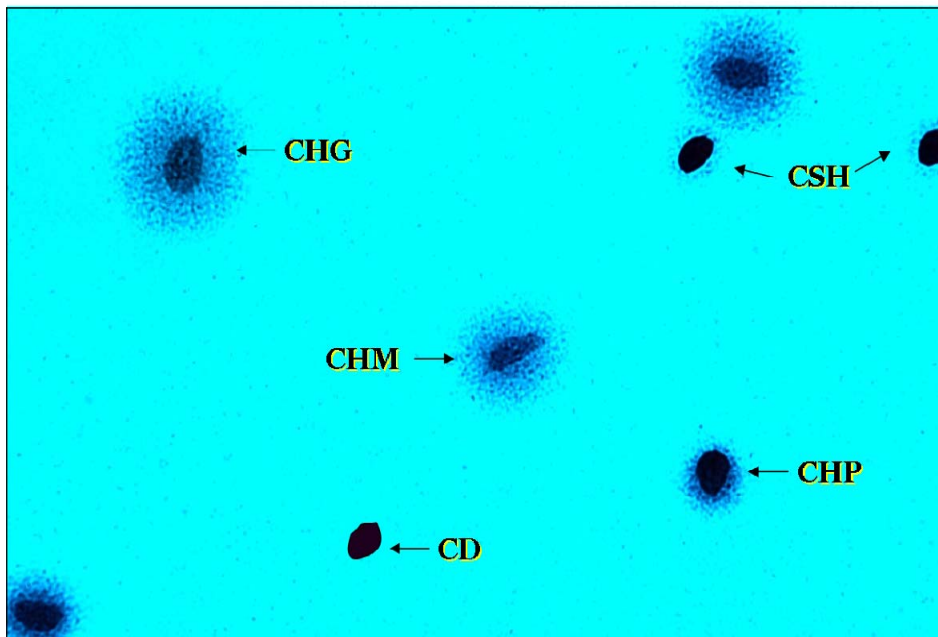
b) Células espermáticas de halo mediano (CHM): su halo está entre aquellos con halo grande y halo muy pequeño.

Células espermáticas sanas (CS): este subgrupo incluye las CHG y CHM, es decir, aquellas sin fragmentación de ADN.

c) Células espermáticas de halo muy pequeño (CHP): su espesor es similar o más pequeño que la tercera parte (1/3) del diámetro menor del nucleoide.

d) Células espermáticas sin halo (CSH)

e) Células espermáticas degradadas (CD): son similares al grupo “d”, pero además están débilmente o irregularmente teñidas. Las células espermáticas de halo pequeño, sin halo y degradadas contienen ADN fragmentado. Finalmente los nucleoides que no corresponden a células espermáticas son separados del recuento.



**Fig 20: Patrones de dispersión de la cromatina en los espermatozoides (Test SCD)**

CHG: Célula de halo grande  
CHM: Célula de halo mediano

CHP: Célula de halo pequeño  
CSH: Célula sin halo  
CD: Célula degradada

## **5.8 SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO:**

Para los análisis de ARNm (n=35), 20 de los pacientes fueron no fumadores y 15 fumadores. Se procedió de igual forma con los análisis de actividad enzimática y GSH celular (n=29), en los cuales resultaron 14 pacientes no fumadores y 15 fumadores.

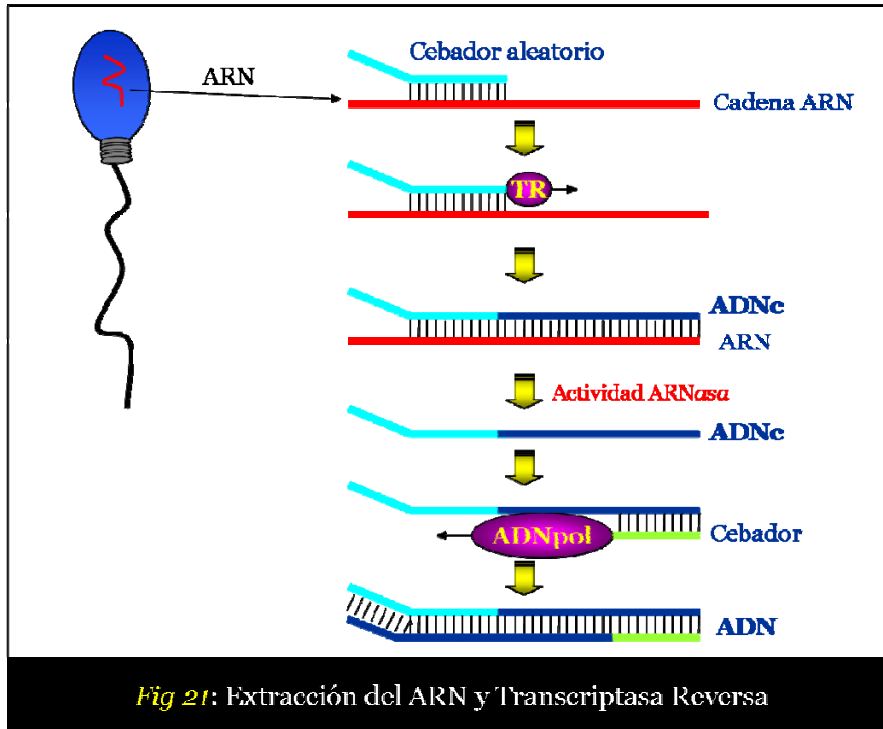
Luego de la licuefacción del semen a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 10 minutos, se evaluaron la concentración y movilidad en una cámara Makler; así como la morfología por el criterio estricto de Tygerberg (Menkveld R, Kruger TF. Morfología espermática. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Reproducción humana. 2d ed. McGraw Hill: Madrid, 2002.). Seguidamente, el número total de espermatozoides recolectados para los experimentos fue estandarizado a 50 millones para proveer suficientes espermatozoides para todos los experimentos mediante su centrifugación por 10 minutos a 400 X g y la eliminación del sobrenadante. Estas muestras fueron tratadas de distinta manera de acuerdo al análisis a realizar: cuantificación de proteínas y actividad o expresión enzimática. Mediante tinción de una extensión de cada muestra con Panóptico Rápido (QCA Barcelona-España), las muestras con leucocitospermia fueron excluidas de este estudio, ya que los niveles elevados de leucocitos (>1 mill/ml) son una fuente importante de ROS (sensibilidad de la prueba: <10.000 leucocitos/ml). Para confirmar lo anterior, se realizó una amplificación del antígeno leucocito-específico CD-45 (Meseguer y cols. 2004).

### **5.8.1 Extracción de ARN mensajero y retrotranscripción (RT)-**

#### **PCR:**

La extracción del ARN se realizó del total de células espermáticas (**Fig 21**), usando como reactivo el Trizol (TelTest. Friendswood.TX). La cantidad total de ARN fue cuantificada mediante espectrofotometría en un espectrofotómetro BioRad (Durviz. Valencia-

España). Posteriormente se realizó la transcripción reversa del ARN mediante el *kit Advantage RT-for-PCR* (Clontech, Palo Alto, CA); el procedimiento se describe a continuación: tras el Trizol se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 25 min y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol utilizado en el paso previo. Se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche y tras otra centrifugación a 13.000 rpm durante 25 min a 4°C se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v) en agua tratada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC). Se volvió a centrifugar por última vez en las mismas condiciones y se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC. Terminada la fase de extracción de ARN espermático, se procedió a la cuantificación en un *SmartSpec 3000 spectrophotometer* (Biorad, Barcelona, España).



Para evitar pérdidas de material genético se procedió a retro-transcribir el ARN a ADN complementario (ADNc). Para ello, se tomó 1 µg de ARN y se utilizó el *kit Advantage RT-for-PCR* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL y se calentó a 70 °C durante 2 min para desnaturalizar las cadenas de ARN y evitar la estructura secundaria de las mismas. Después de esos 2 min se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de dNTP mix (mezcla de nucleótidos) (10 mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de ARNasa, 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney-Murine Leukemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retro-transcripción. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42 °C y al final 5 min a 94 °C para detener la reacción y destruir la actividad ADNasa. El producto fue diluido hasta un volumen final de 100 µL con agua-DEPC y almacenado a 4 °C hasta su análisis por PCR como describen Meseguer y cols. (Meseguer y cols. 2004).

Las secuencia de cebadores de ARNm de GPx-1, GPx-4 y GR detectadas en células espermáticas fueron encontradas en artículos previos (Meseguer y cols. 2004) y adquiridos en Genotek (Barcelona-España). Las secuencias para la GPx-4 humana fueron obtenidas del “Gen Bank” (National Center for Biotechnology Information, *en web*) y diseñadas usando el software “Gene Fisher” (**Tabla I**). Todos los cebadores fueron diseñados a fin de hibridar en los límites entre dos exones, evitando así la amplificación del ADN espermático.

Gen	Cebador directo (Sense)	Cebador inverso (Antisense)
GPx-1	CCACCAGGAACCTTCTCAAAG	TGGCTTCTTGGACAATTGGC
GR	TTGATAGATGGCATTTCAGGCG	TCCTATGACTACCTGGTGATC
GPx-4	GGCTTCGTGTGCATCGTCA	TGGATCTTCATCCACTTCCACA

**Tabla I:** secuencias de cebadores utilizados

Antes de realizar los experimentos de qf-PCR (PCR semicuantitativa fluorescente), se probaron todos los cebadores por PCR no-fluorescente en un Termociclador Eppendorf (Eppendorf. Hamburgo, Alemania), y el producto se corrió en un gel de agarosa al 2% y fue teñido con bromuro de etidio para detectar la amplificación y tamaño adecuado del producto.

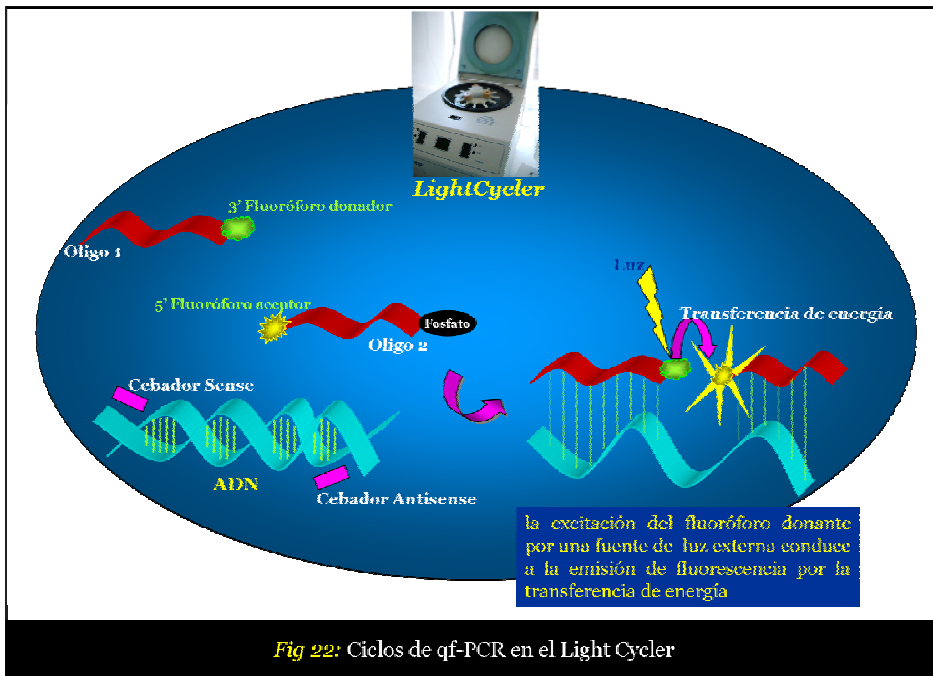
Todos los resultados de qf-PCR fueron normalizados mediante el análisis de la expresión de la  $\beta$ -globina. El tamaño del producto de la PCR de la  $\beta$ -globina fue 200 pares de bases (bp) y los cebadores usados fueron los provistos por el kit de qf-PCR empleado, el cual se describe a continuación. (Dubrovskaya y Wetterhahn. 1998, Romero y cols. 1999).

### **5.8.2 PCR semi-cuantitativa fluorescente (qf-PCR):**

Las cuantificaciones de ARNm se llevaron a cabo mediante qf-PCR con el *kit LightCycler-Fast-Start DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) (**Fig 22**) en 2  $\mu$ l del total de ADN complementario (ADNc), según las instrucciones del fabricante y llevadas a cabo en *Light Cycler* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las PCR fueron realizadas para cuantificar GPx-1, GPx-4 y GR. Las reacciones fueron conformadas sobre 2  $\mu$ l de ADNc total a los que se les añadió 18  $\mu$ l de una mezcla de reacción compuesta de 2  $\mu$ l de  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l del Mix con el SYBR green que provee la casa comercial,



2  $\mu\text{L}$  de los oligonucleótidos iniciadores de la reacción y 12  $\mu\text{L}$  de agua *milliQ*. Para la reacción en sí, se empleó el siguiente programa: 94 °C por 5 min, y posteriormente 45 ciclos de: 94 °C: 8 seg, 58 °C: 10 seg, 72 °C: 10 seg, para terminar una progresiva desnaturalización y comprobar la existencia de un solo amplificado. Se incluyó una curva de calibración en cada experimento y consistía en cinco diluciones seriadas (1/10) de la muestra de espermatozoides con mayor concentración de *mRNA* de GPx-1, GPx-4 y GR para poder interpolar los resultados.



En cada ciclo se midió la fluorescencia verde y los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la curva de amplificación y los puntos de inicio, con la asistencia del programa *Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) (**Fig 23**). La detección de ambos transcritos se hizo en la zona lineal de la gráfica. Los datos se representan como valores relativos y

normalizados con el correspondiente valor del gen  $\beta$ - globina. La especificidad de la amplificación se confirmó mediante el análisis de las curvas de fusión.

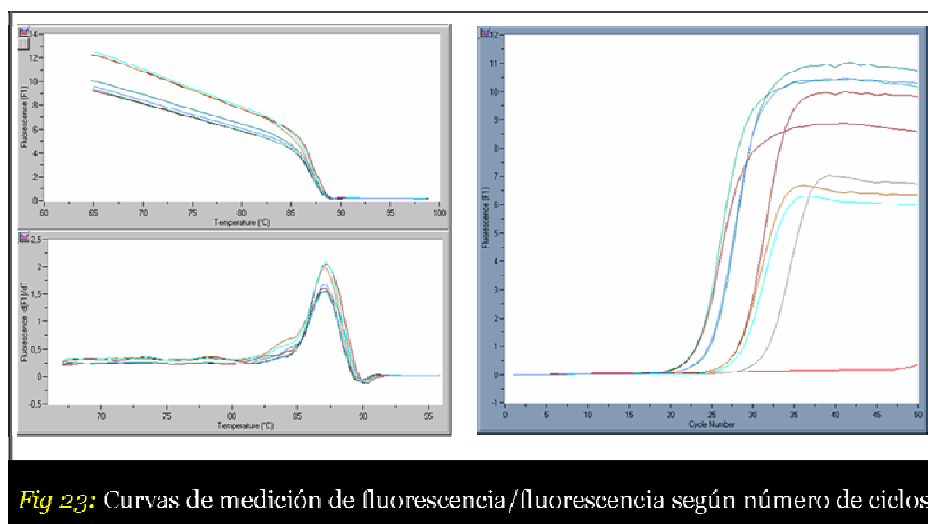


Fig 23: Curvas de medición de fluorescencia/fluorescencia según número de ciclos

### 5.8.3 Mediciones de actividad enzimática:

Las muestras de semen destinadas a los experimentos de total de proteínas fueron lisadas y las fracciones de proteínas se extrajeron usando 350  $\mu$ l de tampón de lisis (20% ácido perclórico en 1mM EDTA). Las suspensiones fueron centrifugadas nuevamente y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones de proteínas y enzimas. Todos los resultados de actividad enzimática fueron normalizados con la cantidad total de proteína. Dichas determinaciones se realizaron según el método de Bradford (Bio-Rad, Durviz, Valencia, España).

La actividad GR (Unidades Internacionales-UI) se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1  $\mu$ mol de glutatión oxidado (GSSG) por minuto a un pH de 7,6 y 25 °C. Esta actividad fue medida para determinar la reducción de GSSG indirectamente a través

de la medición del consumo de Nicotinamida-Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) con la disminución de la absorbancia a 340 nm como una función de tiempo con el Bioxytech GR-340 Spectrophotometric Assay (OxisResearch, Portland, OR).

Las actividades de GPx-1 y GPx-4 (unidades/mg de proteína) se definieron como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de GSH por minuto a un pH de 7 y 37 °C. Las actividades GPx-1 y GPx-4 se midieron nuevamente de forma indirecta por espectrofotometría, calculando el consumo de NADPH debido a la adición de GR, por la disminución de la absorbancia a 340 nm como una función de tiempo cuando la GPx primero transforma GSH a GSSG y por la reducción de hidróxido de cumene (Sigma), el cual actúa como donante de electrones de GPx-1 (Meseguer y cols. 2004). El hidroperóxido de fosfatidilcolina se utilizó como sustrato específico para la GPx-4. Lentamente, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de muestra a 590  $\mu\text{l}$  de la solución 1 (EDTA 1 mM, ácido sódico y tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7; Sigma, St. Louis, MI). Luego, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de 2,4 unidades/ml de GR diluido previamente en el tampón y 100  $\mu\text{l}$  de GSH 10 mM, y la solución fue incubada a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente 100  $\mu\text{l}$  de una solución de 1,5 mM de NADPH disuelta en  $\text{NaHCO}_3$  0,1% y la oxidación del NADPH independiente de hidroperóxido se monitorizó durante 3 minutos. Finalmente, se añadieron a la reacción 100  $\mu\text{l}$  de 1,5 mM de hidroperóxido de cumene (Sigma) o de 40  $\mu\text{M}$  de hidroperóxido de fosfatidilcolina (gentilmente proporcionado por la Dra. Matilde Maiorino, Universidad de Padova, Italia) y se registró la disminución de la absorbancia a 340 nm.

#### **5.8.4 Contenido de GSH:**

Para medir la concentración de GSH se llevó a cabo un procedimiento similar, creando una reacción bioquímica. El medio ácido

en el que estaban resuspendidas las muestras fue basificado añadiendo volúmenes conocidos de  $K_2HPO_4$  al 40%, y luego se centrifugó a 12.000 g durante 5 min. para precipitar el perclorato de potasio.

Alícuotas de 930  $\mu$ l de la solución 1, seguidas de 10  $\mu$ l de la solución 2 (0,02 gr de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Sigma, en 10 ml de etanol) y 50  $\mu$ l de la muestra a estudiar se añadieron inicialmente a una cubeta antes de su introducción en el espectrofotómetro. La reacción se inició al añadir 20  $\mu$ l de la solución 3 (500 UI/ml de GSH-S transferasa, Sigma, en tampón fosfato 0,1 M; pH 7,0) y se monitorizó el aumento de la absorbancia a 340 nm hasta que alcanzó el plateau (cuando reaccionó todo el GSH). Los cálculos se hicieron considerando el volumen de la muestra, trayectoria de la longitud de onda, factores de dilución correspondientes, disminuciones de absorbancia y coeficiente de extinción molar.

#### **5.8.5 Determinación de daño oxidativo del ADN espermático:**

De cada una de las muestras (n=55), 30 procedentes de hombres no fumadores y 25 de fumadores, se reservaron alícuotas de semen fresco y el resto fue capacitado por el procedimiento de swim-up diluyendo 1:1 (vol:vol) con Sperm Medium (MediCult, Jyllinge, Dinamarca) para obtener otra alícuota de semen capacitado de cada muestra. El total de espermatozoides recolectados para los experimentos fue de 2-10 millones por alícuota para proveer suficientes espermatozoides a ser procesados por citometría de flujo.

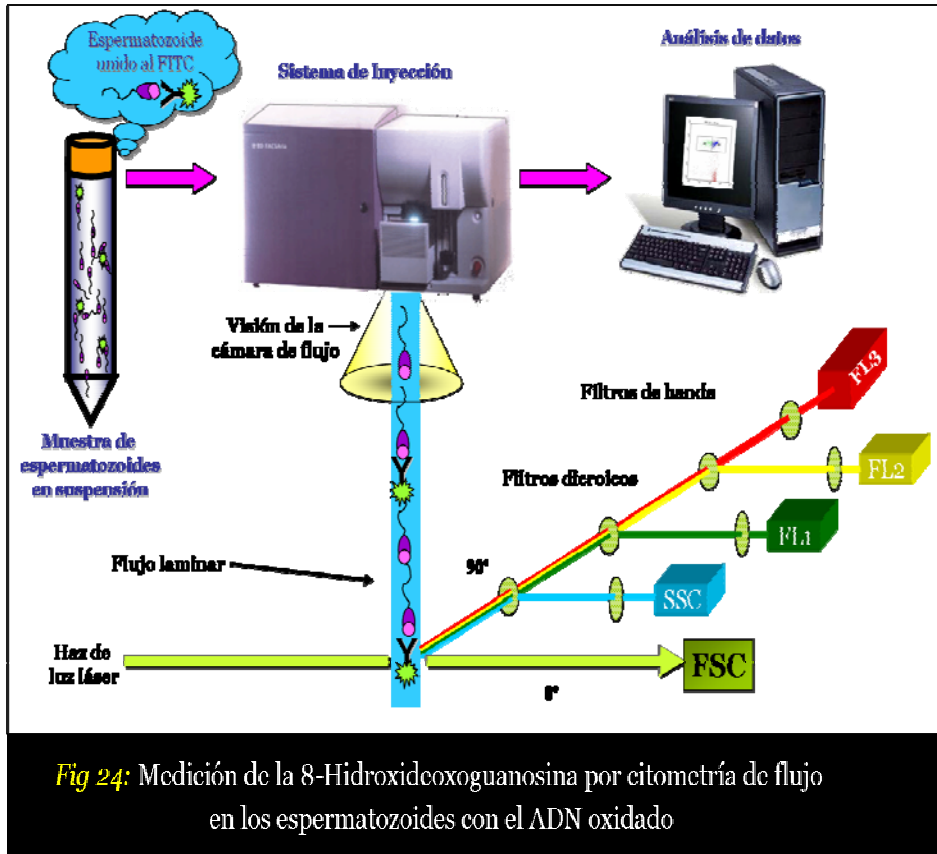
Se realizaron tinciones con Panóptico Rápido (QCA, Barcelona, España) de cada muestra de semen, para determinar si presentaban niveles elevados (>1 millón/ml) de leucocitos (una conocida y relevante fuente de ROS). Las muestras que presentaban leucocitospermia fueron excluidas de este estudio. La sensibilidad de esta prueba es de <10.000

leucocitos/ml. Para confirmar lo anterior, se realizó una amplificación del antígeno leucocito-específico CD-45 (Meseguer y cols. 2004).

#### **5.8.6 Medición de la 8-oxoquanina por citometría de flujo:**

La prueba OxyDNA (*OxyDNA assay kit*, Calbiochem, Barcelona, España) está basada en la unión directa de una sonda fluorescente a porciones de 8-oxoquanina (un marcador sensible de daño al ADN causado por los radicales libres) en el ADN de células fijadas para la detección de daño oxidativo del ADN *in vitro*. La fluorescencia fue cuantificada usando citometría de flujo (esta prueba es realizada y observada directamente en células). En cada una de las muestras a estudiar, tanto del semen en fresco como en el capacitado, las células espermáticas fueron lavadas 2 veces en PBS, luego fijadas y permeabilizadas con etanol al 70% mantenido previamente a -20 °C. Las células en suspensión fueron almacenadas hasta 2 semanas a -20 °C. Posteriormente las mismas fueron centrifugadas a 230 g por 5 min., se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces en PBS. Luego, fueron resuspendidas en 3 ml de Solución de Lavado (Tampón Tris-Salino/TWEEN® 20 Detergente (TBST), contiene Timerosal), centrifugadas a 230 g durante 5 min., descartando nuevamente el sobrenadante y bloqueando los sitios de unión no-específicos con 50 µl de Solución de Bloqueo (provisto por el kit y preparado al momento de su adición) durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente se añadieron 3 ml de Solución de Lavado, se repitieron 2 lavados más, descartando el sobrenadante con mucho cuidado y el pellet obtenido se incubó durante toda la noche con 100 µl del anticuerpo monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 4 °C. Luego, las muestras se lavaron 2 veces (Solución de Lavado) y las células fueron resuspendidas en 2 ml de PBS, y se mantuvieron en la oscuridad y en hielo hasta

resuspender en fluido en el FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) o citómetro de flujo para su análisis (**Fig 24**).



**Fig 24:** Medición de la 8-Hidroxidexoguanosina por citometría de flujo en los espermatozoides con el ADN oxidado

El análisis por citometría de flujo se realizó en un Epics Elite Flow Cytometer (Coulter Cytometry, Hialeah, FL) usando un láser de ión-argón a 488 nm y 15 mW. El debris fue excluido del análisis por sus propiedades de scatter. Se almacenaron al menos 10000 eventos por muestra. Los datos se expresaron en forma de porcentaje de células teñidas (comparados con controles negativos) e intensidad de fluorescencia medida como FAU (unidad de fluorescencia arbitraria) (de Zwart y cols. 1999).

## **5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA RELACIONAR:**

### **5.9.1 Calidad seminal y tabaco:**

Con el fin de comparar los parámetros básicos de semen en los 3 grupos de pacientes fumadores, se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples post-hoc con la prueba de Bonferroni en aquellos valores que resultaron significativamente diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron con el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística fue definida en  $p < 0,05$ .

### **5.9.2 Sex ratio, aneuploidías y tabaco**

Para analizar las diferencias estadísticas entre los 3 grupos, con respecto a las anomalías cromosómicas en espermatozoides y el sex ratio de los mismos, se realizó un ANOVA de proporciones, seguido de múltiples comparaciones post-hoc con la prueba de Bonferroni en los valores que resultaron significativamente diferentes. Para analizar las diferencias en el sex ratio de los espermatozoides en las muestras procedentes de los donantes se utilizó la  $U$  de Mann Whitney; y las comparaciones entre el sex ratio de los embriones en los 3 grupos de estudio se llevó a cabo mediante la  $X^2$ , Odds Ratio y el intervalo de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS (Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística fue definida por  $p < 0,05$ .

### **5.9.3 Fragmentación del ADN y tabaco**

Para las comparaciones de la fragmentación del ADN con respecto a los 3 grupos estudiados antes y después del swim-up, se realizó un análisis de ANOVA cuando los datos seguían una distribución normal, mientras que cuando estas seguían una distribución anormal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica). El análisis

estadístico fue llevado a cabo, usando el SPSS (Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística se definió como  $p < 0,05$ .

#### **5.9.4 Estrés oxidativo, sistema antioxidante y tabaco:**

Para la comparación de grupos se empleó la Prueba T como prueba paramétrica cuando los datos seguían una distribución normal. La significancia estadística se definió como  $p < 0,05$ .







## **6. RESULTADOS**






A continuación se describen los resultados obtenidos de esta investigación según las relaciones estudiadas:

### 6.1 Parámetros seminales y tabaco:

La **Tabla II**, refleja el resultado del análisis básico del semen en los grupos estudiados, donde se observó que los parámetros seminales (concentración espermática, espermatozoides móviles progresivos y morfología) fueron relativamente similares en los 3 grupos de acuerdo a la condición de fumador de los mismos, sin embargo se advirtieron disminuciones estadísticamente significativas en la movilidad tipo “A+ B” de los hombres no fumadores respecto a los fumadores moderados (no así con los muy fumadores) y entre los fumadores moderados y los muy fumadores; no obstante aún cuando los valores de este parámetro han resultado significativos, podría deberse a la “n” del grupo muestral y consideramos que la diferencia no debería indicar una relevancia clínica del efecto del tabaco.

**Tabla II:** Parámetros seminales de acuerdo al número de cigarrillos fumados por los hombres

	No fumadores 	Fumadores 	
		1-19 cig/día	≥20 cig/día
Nº de pacientes	3201	942	1188
Edad media (años)	33,6	36,3	37,6
Media de concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml) (DE)	43,73 (44,00)	43,46 (33,23)	43,23 (41,39)
Media de movilidad tipo “A+B” (%) (DE)	40,11 (19,18) <sup>a</sup>	37,82 (20,43) <sup>b</sup>	40,08 (19,74) <sup>a</sup>
Media de movilidad tipo “C” (%) (DE)	12,05 (7,86)	12,76 (8,25)	12,67 (8,13)
Media de movilidad tipo “D” (%) (DE)	43,30 (20,16)	46,27 (22,31)	44,28 (20,74)
Media de total de móviles progresivos (10 <sup>6</sup> ) (DE)	78,38 (108,18)	70,38 (109,61)	71,93 (100,88)
Media de morfología espermática normal (%) (DE)	7,47 (7,67)	7,89 (9,11)	7,77 (8,17)




Datos representados como medias y desviaciones estándar: ANOVA -Media de movilidad A+B  $p=0,006$

( $p^{a,b}=0,005$ ;  $p^{b,c}=0,030$ )

## 6.2 FISH de espermatozoides y tabaco:




En el análisis de FISH de espermatozoides de los pacientes estudiados, no se observaron diferencias significativas respecto a la incidencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides para los cromosomas analizados (13, 18, 21, X e Y) (*Tabla III*); así como tampoco en el ratio Y:X de los espermatozoides entre los 3 grupos establecidos (*Tabla IV*).

**Tabla III:** Resultados de FISH de espermatozoides de acuerdo al número de cigarrillos fumados por los hombres

	No fumadores 	Fumadores 	
		1-19 cig/día	>20 cig/día
Nº de pacientes	31	10	15
Nº de espermatozoides evaluados para cromos. X/Y/13	67131	22046	37034
% Disomías para los cromosomas sexuales	0,4	0,4	0,4
% Disomías para el cromosoma 13	0,03	0,03	0,01
Nº de espermatozoides evaluados para cromos. 13/21	29347	19926	34159
% Disomías para el cromosoma 13	0,1	0,1	0,03
% Disomías para el cromosoma 21	0,1	0,2	0,1

*ANOVA de proporciones:* no se observaron diferencias significativas entre los grupos

**Tabla IV:** Resultados de ratio Y:X de espermatozoides de acuerdo al número de cigarrillos fumados por los hombres




	No fumadores 	Fumadores 	
		1-19 cig/día	≥20 cig/día
Nº de pacientes	31	10	15
Medida de ratio Y:X (DE)	0,97 (0,08)	0,94 (0,08)	0,97 (0,10)

*ANOVA:* no se observaron diferencias significativas entre los grupos

### 6.3 FISH de embriones y tabaco:

Referente a los estudios de DGP (**Tabla V**), no se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos con respecto a las tasas de fecundación y desarrollo embrionario. Así mismo, el porcentaje de embriones anormales para los cromosomas analizados (13, 16, 18, 21, 22, X e Y) fue comparable entre éstos. No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de embriones masculinos: femeninos (XY:XX) de acuerdo a la condición de fumador de los hombres. En el grupo de hombres muy fumadores, el ratio XY:XX se vio disminuido significativamente en comparación con el de los hombres no fumadores ( $p=0,005$ ).

**Tabla V: Resultados de los ciclos de DGP de acuerdo al número de cigarrillos fumados por los hombres de la pareja.**




		No fumadores 	Fumadores	
			1-19 cig/día	≥20 cig/día
 Oocitos	MII intactos	421	113	166
	2 PN (%)	302 (71,7)	80 (70,8)	127 (76,5)
	3 PN (%)	16 (2,4)	4 (3,5)	2 (1,2)
	1 PN (%)	22 (5,9)	7 (6,2)	10 (6,0)
 Embriónes	Nº Biopsiados (%)	214 (70,9)	38 (72,3)	100 (78,7)
	Nº Informativos (%)	196 (89,3)	54 (93,1)	90 (90)
	Nº Anormales (%)	126 (62,8)	38 (70,4)	37 (63,5)
	XY:XX	80:71 <sup>a</sup>	21:22	22:47 <sup>b</sup>

Prueba <sup>(a,b)</sup> $\chi^2$  y odds ratio (OR) [intervalo de confianza del 95 % (IC)]: (OR 2,41; IC 95% 1,32-4,38;

$p^{a,b} < 0,005$ ) MII- metafase II; PN- pronúcleos

La **Tabla VI** muestra el efecto de la condición de fumadora en la mujer de la pareja y el ratio XY:XX de los embriones. En el grupo de los hombres no fumadores, no se observaron diferencias significativas en el ratio de los embriones de acuerdo a la calidad de fumadora de la mujer, aunque, en las mujeres que fumaban entre 1-19 cig/día hubo una tendencia a disminuir el ratio XY:XX ( $p=0,005$ ). Sin embargo, cuando se compara lo contrario; en el grupo de las mujeres no fumadoras, cuando los hombres fumaban más de 20 cig/día, el ratio XY:XX disminuye significativamente con respecto a los no fumadores.

**Tabla VI: Condición de fumador de ambos miembros de la pareja y el ratio XY: XX de los embriones**

 	No Fumadores	Fumadores	
	 embriones XY:XX	1-19 cig/día embriones XY:XX	≥20 cig/día embriones XY:XX
No fumadoras	56:40 <sup>a</sup>	14:13	10:27 <sup>b</sup>
1-19 cig/día	19:28	7:7	12:20
≥20 cig/día	5:3	-	-

Prueba  $\chi^2$  y OR (IC 95 %) con prueba exacta de Fisher:  
(OR 3,78; IC 95% 1,63-8,68;  $p^{a,b}=0,001$ )

Debido a la poca coherencia que reflejaban los resultados hallados en los espermatozoides respecto a los encontrados en los embriones (que sí coincidían con los observados en RNV en los trabajos previos), decidimos evaluar un grupo de muestras por FISH antes y después del capacitado para tratar de encontrar una posible respuesta a estos hallazgos.



Así, la **Tabla VII a)** muestra los resultados generales de FISH de espermatozoides (total de células evaluadas) en las muestras de semen de 4 donantes muy fumadores y 4 no fumadores (grupo control) antes y después del swim-up y la **Tabla VII b)** muestra el resultado de los ratios Y:X de los mismos. Las comparaciones entre estos 2 grupos revelaron que en aquellos expuestos al tabaco, el ratio Y:X de los espermatozoides tras el swim-up disminuían significativamente ( $p=0,021$ ), lo que nos indica un enriquecimiento significativo de los espermatozoides portadores del cromosoma X en las alícuotas post swim-up de los donantes muy fumadores. Este hallazgo sugiere que el tabaco altera selectivamente el efecto de la capacitación espermática.

**Tabla VII: Resultados del análisis de FISH de espermatozoides en muestras de semen de 4 donantes fumadores y 4 donantes no fumadores (grupo control) antes y después de su procesamiento por swim-up.**

a) Resultados generales

♂	Swim-up	Donantes no fumadores			Donantes fumadores		
		Evaluados XY18	Total X (%)	Total Y (%)	Evaluados XY18	Total X (%)	Total Y (%)
1	Esa	6131	2999 (48,0)	3119 (51,0)	3094	2323 (69,8)	2346 (50,2)
	Post	3982	2900 (48,6)	3062 (51,4)	3169	2665 (51,6)	2492 (48,4)
2	Esa	6182	3165 (51,4)	2998 (48,6)	3709	2333 (64,3)	3137 (53,3)
	Post	6049	3033 (50,2)	3006 (49,8)	3009	2616 (52,4)	2379 (47,6)
3	Esa	6239	3182 (51,3)	2996 (48,3)	4848	2394 (69,6)	2423 (50,4)
	Post	6093	3000 (49,7)	3037 (50,3)	6437	3341 (51,8)	3110 (48,2)
4	Esa	6030	2901 (48,1)	3137 (51,9)	7573	3971 (52,3)	3392 (47,3)
	Post	6029	2893 (48,0)	3133 (52,0)	10320	3323 (53,7)	4766 (46,3)
Total	Esa	24.622	12.247 (50,0)	12.230 (50,0)	23.219	11.421 (49,3)	11.728 (50,7)
	Post	24.133	11.828 (49,1)	12.238 (50,9)	26.983	14.143 (52,6)	12.747 (47,4)

## b) Ratios

N°	Donantes no fumadores:		Donantes muy fumadores:	
	Ratio Y:X	Ratio Y:X	Ratio Y:X	Ratio Y:X
	pre swim-up	post swim-up	pre swim-up	post swim-up
1	1,04	1,06	1,01	0,94
2	0,95	0,99	1,25	0,91
3	0,94	1,01	1,02	0,93
4	1,08	1,08	0,90	0,86
Media ± SEM	1,003 ± 0,005	1,035 ± 0,002 <sup>a</sup>	1,045 ± 0,021	0,910 ± 0,001 <sup>b</sup>

U de Mann-Whitney: significancia estadística en el ratio Y:X tras swim-up entre donantes no fumadores y muy fumadores:  $P^{ab} = 0,021$ .

Todas las muestras de semen de los donantes (fumadores y no fumadores) presentaron una concentración y una movilidad A+B normal de acuerdo a los criterios de la OMS (WHO, 1999) tanto en la evaluación de las muestras en fresco como después del swim-up, aún cuando en 3 de los 4 donantes muy fumadores, la morfología espermática (según el criterio estricto de Kruger) estaba alterada, comparado con los donantes no fumadores (datos procedentes de la investigación, no reflejados en tabla VII), sin embargo las diferencias no resultaron significativas.

#### 6.4 Fragmentación del ADN y tabaco:

Los resultados de la fragmentación del ADN de espermatozoides en las muestras de los pacientes antes de ser procesadas por swim-up de acuerdo al número de cigarrillos fumados por los varones (**Fig 25a**), no revelaron diferencias significativas entre los 3 grupos estudiados dependiendo del consumo de tabaco diario. Hombres no fumadores, fumadores moderados y muy fumadores, tuvieron similar patrón de distribución entre las diferentes categorías de acuerdo al tamaño del

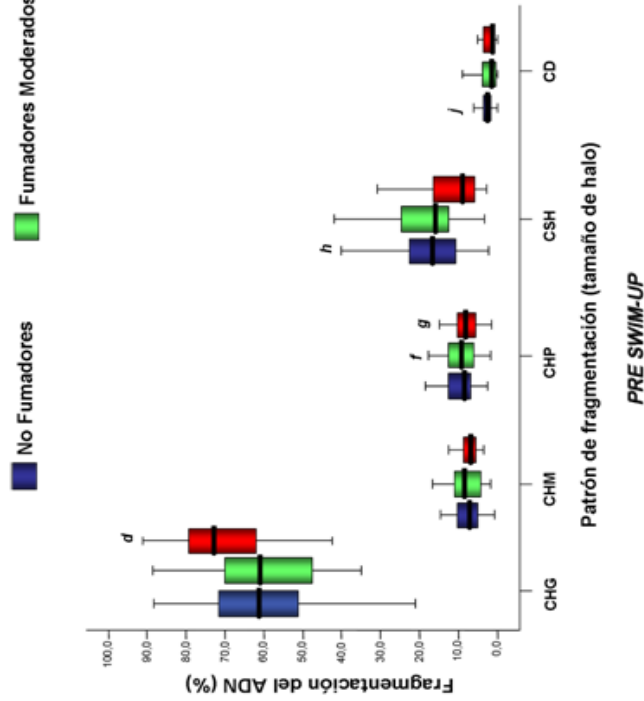
---

halo tras evaluar el resultado del análisis SCD, es decir, porcentajes similares de CHG, CHM, CHP, CSH y CD.

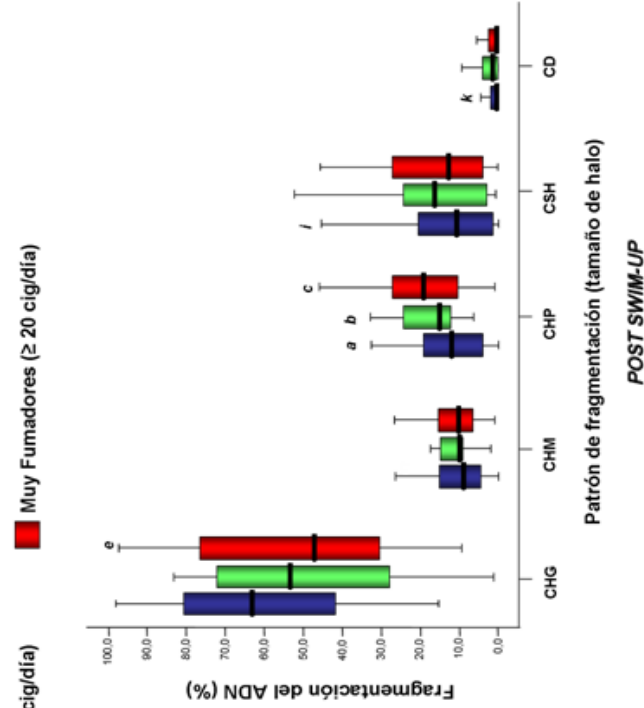
La **Fig 25b**, muestra los resultados de la fragmentación del ADN de espermatozoides en las muestras luego de ser procesadas por swim-up de acuerdo al número de cigarrillos fumados. Comparaciones entre los tres grupos muestran diferencias significativas en algunos patrones celulares estudiados. Los porcentajes de CHP en los fumadores moderados se incrementaron respecto a aquellos que no fumaban (15,0 IC 95% [6,4-46,0] vs. 12,2 IC 95% [0,0-32,7]) ( $p^{ab}=0,020$ ), al igual que en los hombres muy fumadores comparado con el grupo de los no fumadores (19,2 IC 95% [0,9-46,0] vs. 12,2 IC 95% [0,0-32,7]) ( $p^{ac}=0,013$ ), demostrándose así un daño en la calidad del ADN entre fumadores en general (moderados y muy fumadores) y no fumadores. Además, los porcentajes de CHG se vieron disminuidos en los dos grupos de hombres fumadores comparados con aquellos que no fumaban, aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas.

De igual forma, los porcentajes de CSH y CD en los espermatozoides de los fumadores moderados reflejaron que los daños estaban incrementados, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

**Fig 25 a:** Fragmentación del ADN según la condición de fumador y el patrón de fragmentación (test del SCD) antes del capacitado



**Fig 25 b:** Fragmentación del ADN según la condición de fumador y el patrón de fragmentación (test del SCD) después del capacitado.



Prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis según tipo de distribución:  $p^{cd}=0,020$ ;  $p^{ac}=0,013$ ;  $p^{de}=0,020$ ;  $p^{f}=0,001$ ;  $p^{g}<0,001$ ;  $p^{h}<0,007$ ;  $p^{i}=0,006$

---

Posteriores comparaciones múltiples entre la fragmentación del ADN de las muestras de semen antes y después del swim-up de acuerdo al número de cigarrillos fumados (comparaciones entre figuras **25a** y **25b**), mostraron que en los hombres muy fumadores hubo una disminución significativa de las CHG ( $p^{de}=0,020$ ) tras el swim-up (aproximadamente del 50%: 72,8 IC 95% [23,8-67,3] vs. 47,3 IC 95% [9,4-97,4]). En las CHM, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos antes y después de la capacitación.

Por otra parte, en el mismo gráfico se puede observar, desde otro punto de vista que, las CHP (células fragmentadas) incrementaron significativamente tras el swim-up en los fumadores moderados y muy fumadores en comparación con aquellos hombres sin este hábito ( $p^{fb}=0,001$  y  $p^{gc}<0,001$  respectivamente), lo cual indica una selección positiva de espermatozoides con ADN fragmentado al capacitar en los hombres fumadores. Particularmente en los hombres muy fumadores este incremento fue de más del 100%.

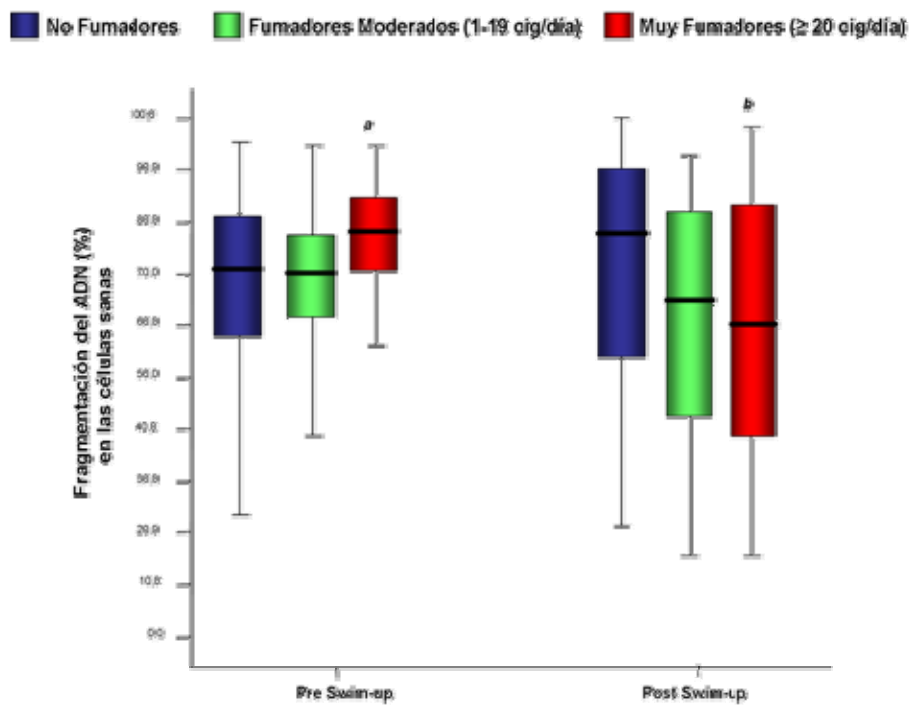
En la gráfica (**Fig 25a vs. 25b**) resulta interesante que en los hombres no fumadores se aprecia una gran disminución de las CSH y CD luego del swim-up ( $p^{hi}=0,007$  y  $p^{jk}=0,006$  respectivamente) comparado con los resultados antes del capacitado, lo cual supone una reducción de espermatozoides con ADN fragmentado en estos grupos.

Por tanto, estos hallazgos en las alícuotas post swim-up sugieren que el tabaco altera selectivamente la habilidad del proceso de selección espermática en los hombres fumadores.

En la **Fig 26** se representa la agrupación de las células sanas (CS), es decir, el total de células no fragmentadas, de los 3 grupos estudiados según el hábito de fumar, y el resultado antes y después del capacitado. Hombres no fumadores, fumadores moderados y muy fumadores tuvieron un porcentaje de fragmentación similar en las CS antes del swim-up. Sin embargo, tras el swim-up se advierte una

disminución importante de las CS en el grupo de los fumadores moderados y muy fumadores respecto a aquellos que no fuman, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

**Fig 26:** Fragmentación del ADN en las células sanas según la condición de fumador antes y después del capacitado.



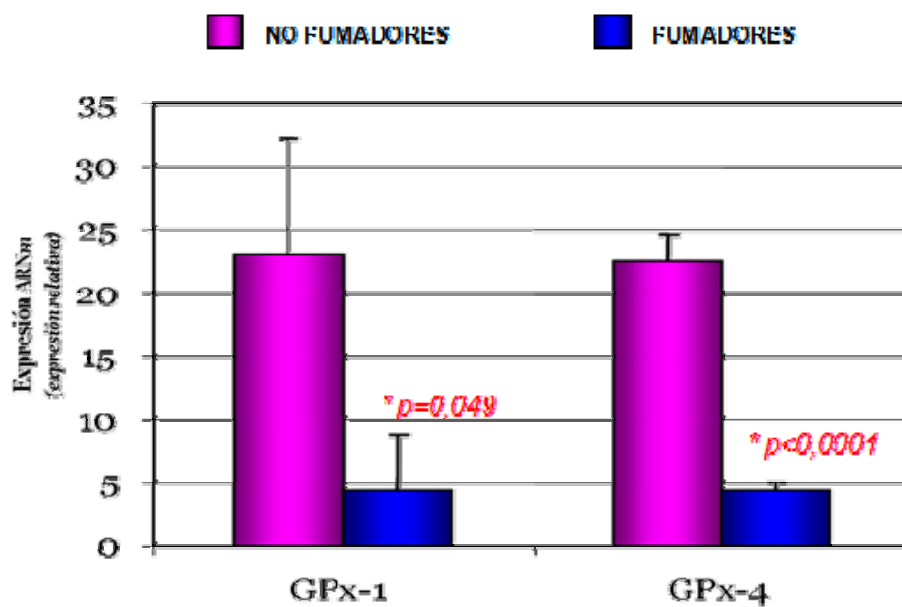
Prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis según tipo de distribución:  $p^{ab} < 0,001$

---

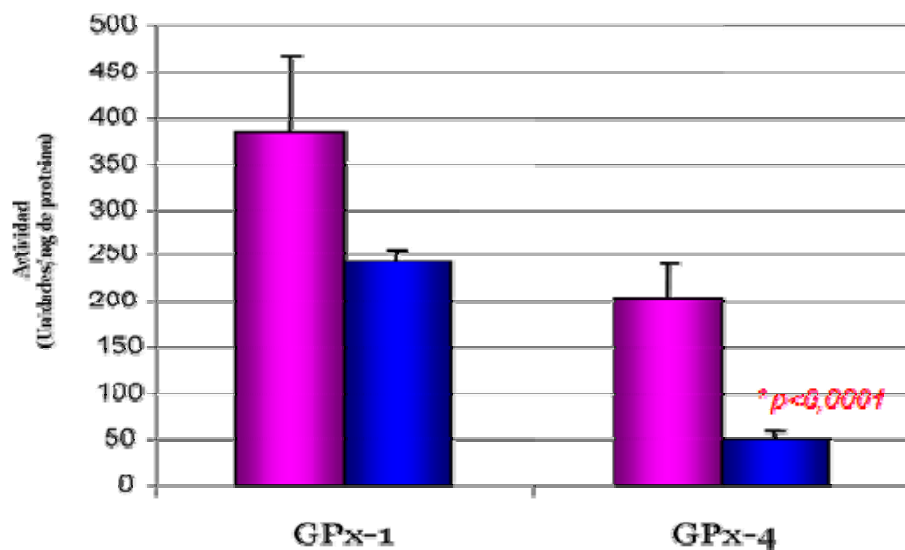
Al realizar comparaciones múltiples antes y después del capacitado en la misma **Fig 26**, se observa una disminución muy marcada en las CS, de los hombres muy fumadores luego del capacitado en comparación con el resultado obtenido antes del mismo ( $p^{ab}<0,001$ ) (78,7 IC 95% [44,4-95,3] vs. 60,0 IC 95% [15,4-98,7]); adicionalmente, se advirtió un incremento de las células sanas en el grupo de hombres no fumadores tras el procesamiento por swim-up, pero éste no fue significativo.

### 6.5 Sistema antioxidante y tabaco

Cuando correlacionamos la condición de fumador de los pacientes con la expresión de ARNm de la GPx-1 y GPx-4, y contenido de GSH en los espermatozoides, así como con la actividad de la GPx-1, GPx-4 y GR; se registró una disminución significativa en las expresiones de ARNm de ambas isoformas enzimáticas: GPx-1 y GPx-4 ( $p<0,0001$ ) (**Fig 27**); y de la GR ( $p<0,0001$ ) (**Fig 29**) en el grupo de fumadores al compararlos con los no fumadores. Sin embargo al medir sus actividades se observó que la GPx-1 en los fumadores disminuía un poco pero no fue significativo respecto a los no fumadores; no obstante, la actividad de la GPx-4 (isoforma específica del espermatozoide) resultó significativamente disminuida en los hombres fumadores ( $p<0,0001$ ) (**Fig 28**). Por otra parte, la actividad de la GR disminuyó considerablemente en los fumadores pero la diferencia no resultó significativa (**Fig 30**). Respecto a la cantidad de GSH (**Fig 31**), en el grupo de hombres fumadores se observó una disminución de los niveles de esta enzima, sin embargo la diferencia no resultó significativa con respecto al grupo de no fumadores.

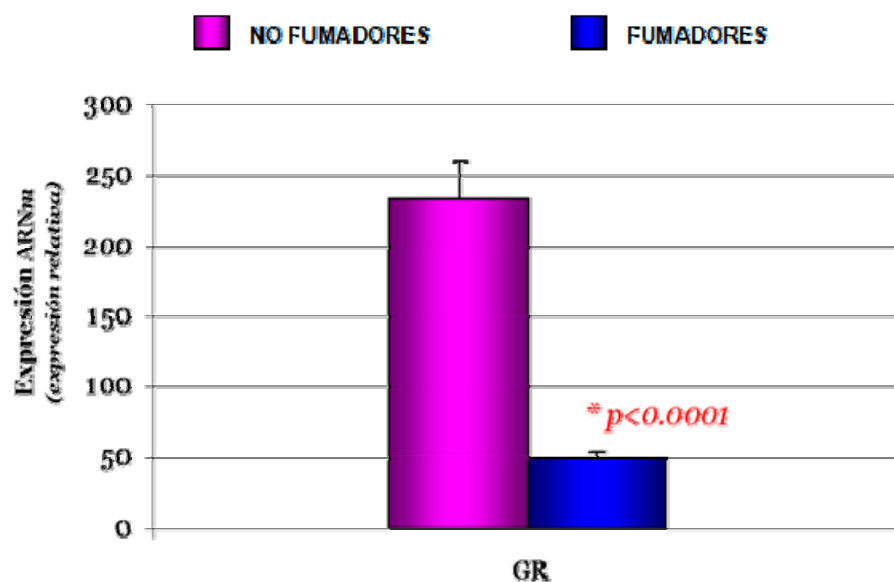


**Fig 27.** Expresión de ARNm de las enzimas GPx-1 y GPx-4 según la condición de fumador. Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar

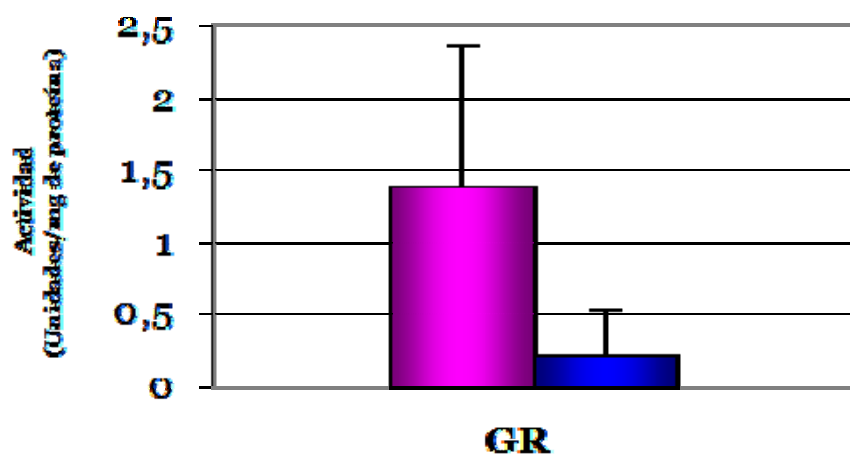


**Fig 28.** Actividad de las enzimas GPx-1 y GPx-4 según la condición de fumador. Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar

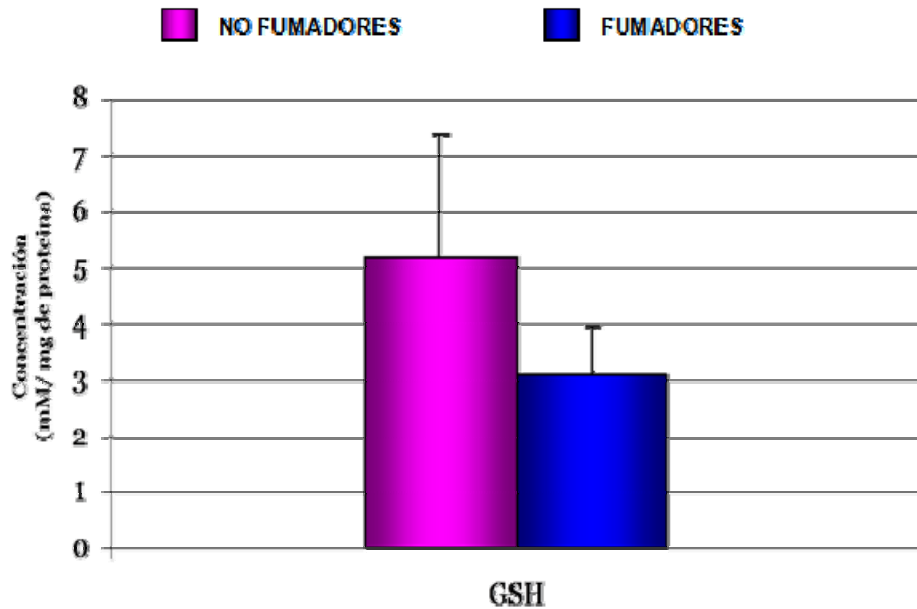




*Fig 29.* Expresión de ARNm de la enzima glutatión reductasa según la condición de fumador. Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar



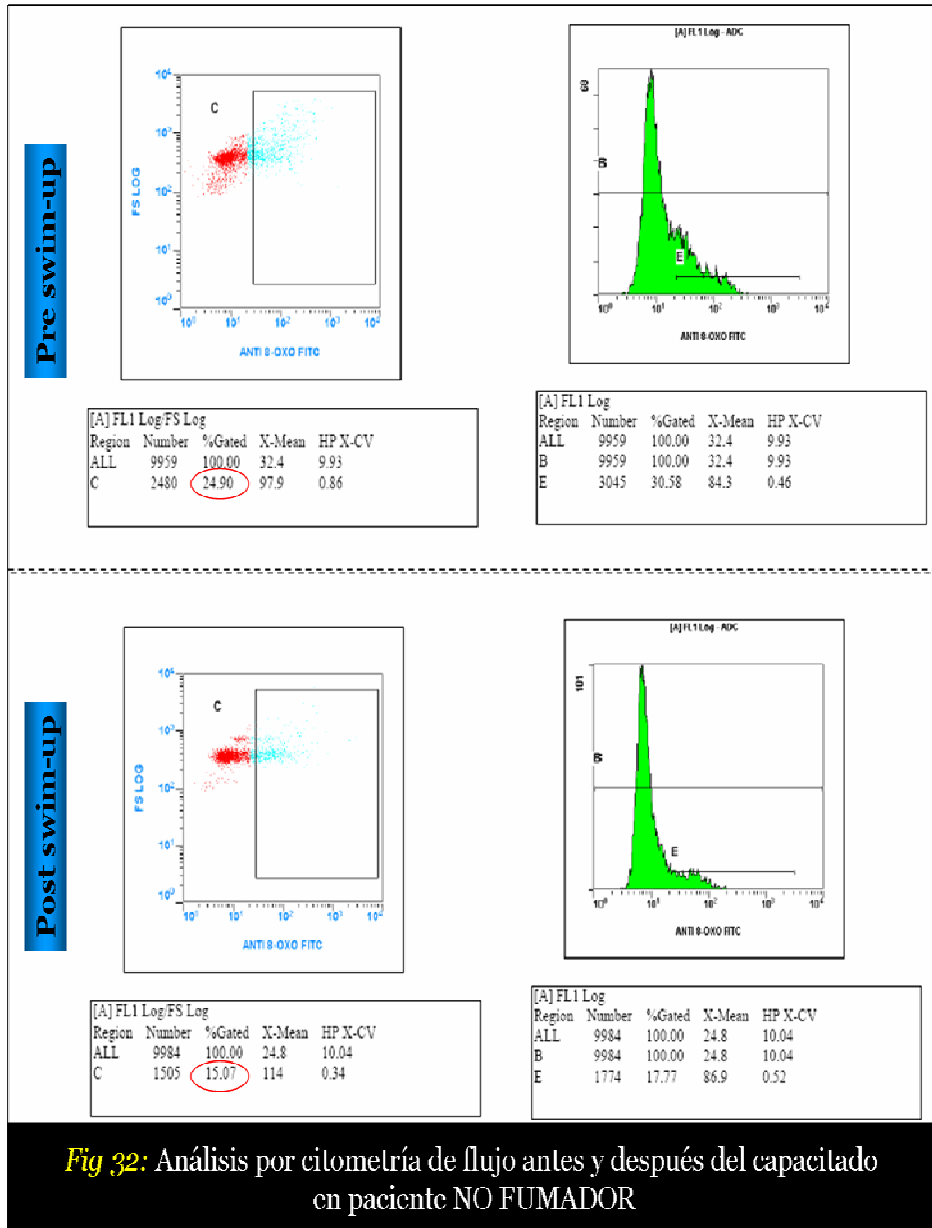
*Fig 30.* Actividad de la enzima glutatión reductasa según la condición de fumador. Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar

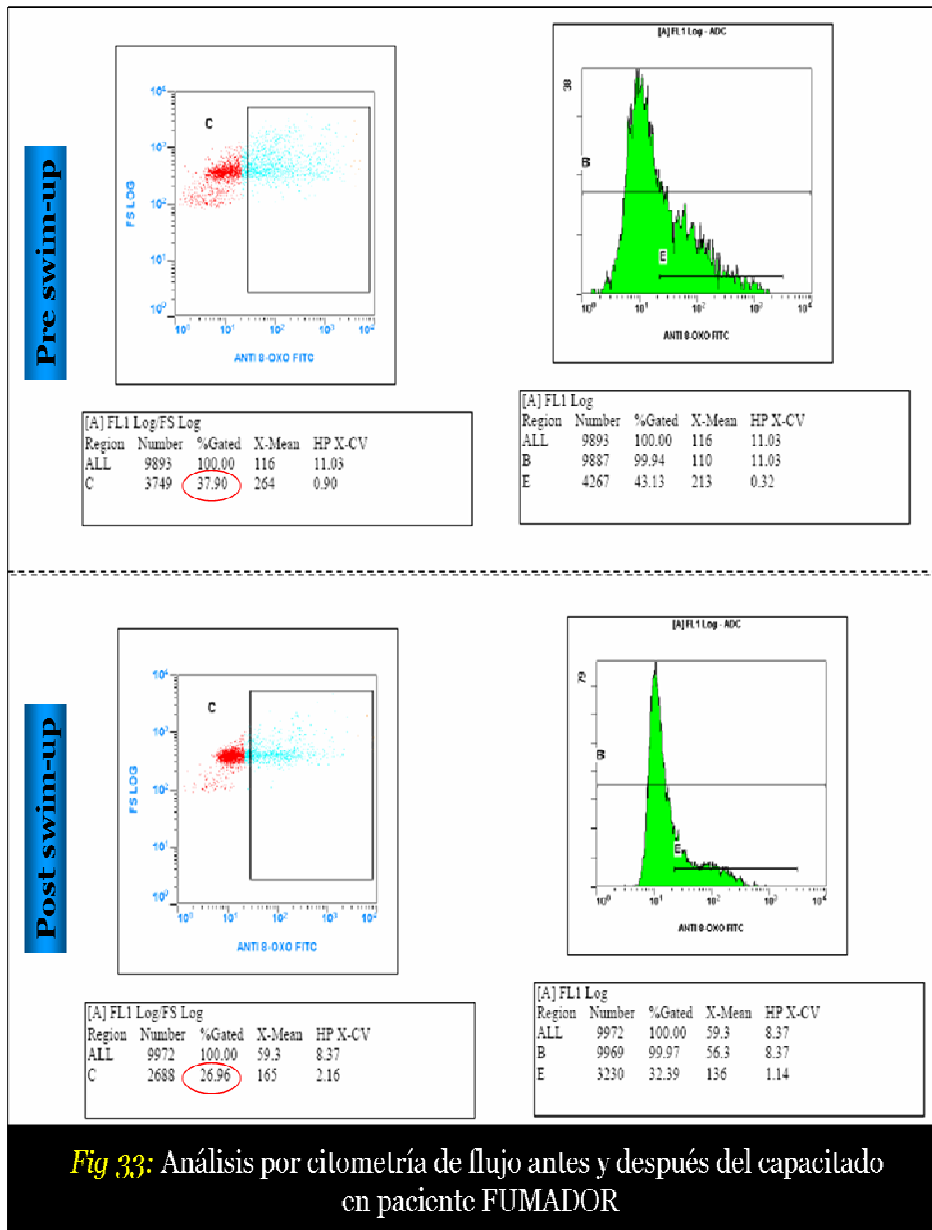


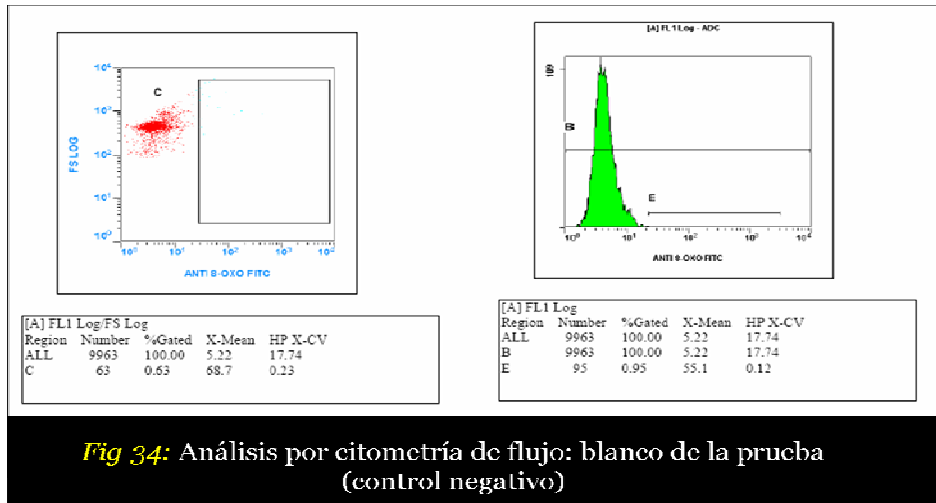
*Fig 31.* Concentración de GSH según la condición de fumador. Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar

### 6.6 Oxidación del ADN espermático y tabaco:

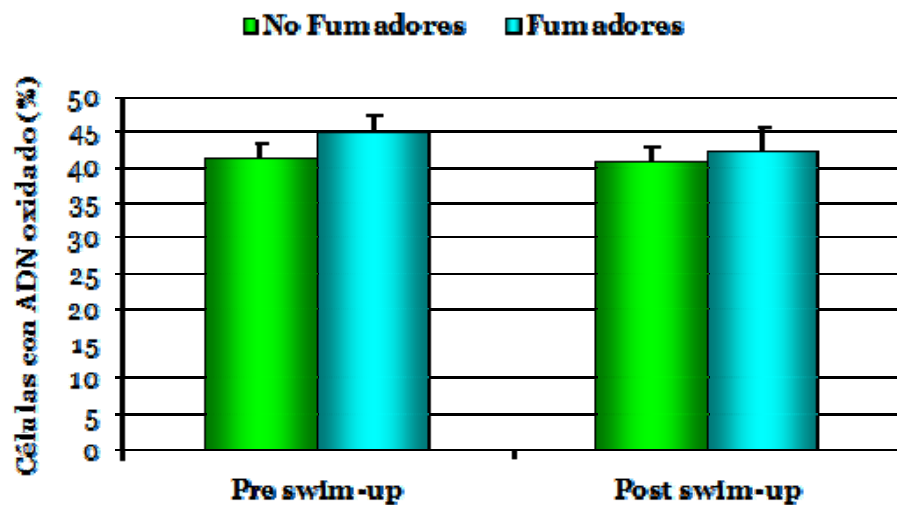
Las siguientes figuras representan un análisis general del estudio por citometría de flujo en las muestras de pacientes no fumadores (*Fig 32*) y fumadores (*Fig 33*) antes y después del capacitado. La *Fig 34* muestra el blanco o control negativo de la prueba. Posteriormente se describen los resultados:







Comparando los niveles de oxidación del ADN según la condición de fumador (**Fig 35**), se observó que, en el análisis de las muestras en fresco los no fumadores tuvieron un 41,14 % de las células oxidadas y los fumadores un 44,87 %, sin embargo esta diferencia no resultó significativa a pesar de encontrarse algo más oxidado el ADN de los espermatozoides procedentes de hombres fumadores. Posteriormente, al evaluar las muestras capacitadas el porcentaje de células oxidadas en los 2 grupos prácticamente llegan a igualarse, sin resultar tampoco significativa la diferencia (40,34 % en los no fumadores y 41,90 % en los fumadores). De igual manera, las comparaciones múltiples antes y después del capacitado no arrojaron diferencias significativas.



*Fig 35.* Porcentaje de células espermáticas oxidadas según la condición de fumador, antes y después del capacitado (swim-up).

Datos representados como Media  $\pm$  Error estándar







## **7. DISCUSIÓN**



Numerosos trabajos sugieren que existen agentes físicos y químicos en el ambiente, muchos de ellos introducidos y propagados por la actividad humana, que pueden afectar de una manera u otra, la fertilidad masculina (Oliva y cols. 2001). Sin embargo, el impacto del consumo de tabaco en la fertilidad masculina resulta un tema bastante controvertido (Vine y cols. 1996).

De los resultados generados de esta investigación, se puede comentar que en cuanto a:

***Calidad seminal y tabaco:***

Muchos estudios han demostrado que el hábito de fumar afecta los parámetros seminales, algunos autores han encontrado alteraciones en cuanto a la concentración, movilidad progresiva y/o morfología (Kunzle y cols. 2003, Merino y cols. 1998, Saaranen y cols. 1987, Sofikitis y cols. 1995, Vine y cols. 1994, Vine y cols. 1996, Wang y cols. 2001, Wentz. 1986, Wong y cols. 2000, Xu y cols. 2003, Zavos y cols. 1998, Zitzmann y cols. 2003); no obstante otros trabajos han concluido que este hábito no afecta los parámetros seminales (Holzki y cols. 1991, Oldereid y cols. 1989, Shen y cols. 1997, Trummer y cols. 2002). Wong y cols. (2000) han advertido que la morfología ha sido uno de los parámetros mayormente afectados por el consumo de cigarrillos. Además, en algunos trabajos se ha sugerido que el fumar cigarrillos está asociado con la retención de la gota citoplasmática en espermatozoides de hombres infértiles, una característica morfológica asociada con inmadurez y problemas de funcionamiento espermático (Jakab y cols. 2003, Mak y cols. 2000).

En este estudio, a pesar de haberse observado una disminución significativa en los espermatozoides móviles tipo "A+B", no se observaron diferencias significativas de grandes magnitudes que nos puedan indicar una relevancia clínica del efecto del tabaco sobre la movilidad. De forma

similar, la concentración, el total de espermatozoides móviles progresivos en las muestras analizadas, así como la morfología espermática, fueron similares en los 3 grupos, concluyendo que en líneas generales la calidad seminal no se ve afectada por el consumo del tabaco.

**Sex Ratio:**

En este trabajo, se ha evidenciado una mayor disminución del ratio de embriones XY:XX provenientes de hombres muy fumadores (10:27 Ratio=0,37) que el que encontraron Fukuda y cols. (2002) en RNV (2864:2911 Ratio=0,98). Estas diferencias podrían deberse al tamaño muestral en los dos estudios, 56 en éste y 11815 en el de Fukuda, y también debido al hecho que los varones infértiles que se realizan un ciclo de ICSI podrían tener una mayor incidencia de descendencia femenina que masculina en comparación con la población general como ha sido sugerido por Sarraf y cols. (1997).

Por el contrario, otros autores no han observado ninguna asociación entre el hábito de fumar durante el período periconcepcional y el sexo de los RNV (Heron y cols. 2004). No obstante, en el estudio de Heron y cols. (2004) las parejas fueron interrogadas sobre sus hábitos tabáquicos justo antes del embarazo, mientras que Fukuda y cols. (2002), lo hicieron en base al consumo de cigarrillos 3 meses antes de la última menstruación, previo a confirmarse el embarazo. De una forma similar, Mills y cols. (2003), evaluaron el efecto del cigarrillo en mujeres durante el período periconcepcional y no encontraron asociación alguna con la disminución del ratio XX:XY en los RNV. Como alternativa, Mills y cols. (2003) se plantean la posibilidad que el tabaco podría dañar selectivamente los espermatozoides portadores del cromosoma Y, haciéndolos más susceptibles a los cambios desfavorables causados por el cigarrillo que los espermatozoides que llevan el cromosoma X, sin

embargo plantean en ese momento que no tenían datos que apoyaran esta hipótesis.

La primera pregunta planteada en nuestro estudio fue si el fumar afectaba producción de la espermatozoides X o Y a nivel testicular; para ello se realizó un FISH de espermatozoides, y como resultado encontramos una proporción similar de espermatozoides portadores del cromosoma X y del Y en los hombres muy fumadores (51% vs 49%), confirmando resultados de trabajos publicados anteriormente (Rubes y cols. 1998). Por lo tanto, el origen de esa disminución del ratio XY:XX de los embriones en los hombres muy fumadores no podría ser atribuido a una variación en la proporción de espermatozoides X e Y.

Posteriormente, luego de analizar los resultados obtenidos en la proporción de los embriones (que será discutido a continuación en el siguiente apartado), la segunda pregunta fue si la preparación del semen para las técnicas de reproducción asistidas (TRA) podría influenciar el sex ratio; por lo cual se estudió el efecto del swim-up en la proporción de los espermatozoides portadores del cromosoma X en muestras de 4 donantes no fumadores y 4 muy fumadores para aclarar si el impacto negativo del tabaco en la calidad seminal podría dar lugar al enriquecimiento de los espermatozoides portadores del cromosoma X; obteniendo como resultado, un incremento significativo en la proporción de los espermatozoides portadores del cromosoma X en la muestras post swim-up. Esta parte de la investigación podría resultar algo controvertida debido al número de donantes estudiados (8), sin embargo dado a que estas muestras se han tomado como controles, se han analizado el doble de células para cada cromosoma que si fuesen pacientes normales, además hay que tomar en cuenta que el FISH de espermatozoides no suele realizarse en las muestras luego de capacitar, lo que lo hace un procedimiento algo más complicado que el de rutina. Por otro lado cabe destacar que este análisis en los donantes se ha

---

realizado posterior a los estudios en espermatozoides y embriones (FISH/PGD) y posterior al análisis de datos en un intento de aclarar la disparidad de los resultados observados en el FISH de las muestras en fresco (que es la alícuota que generalmente se estudia), donde no se encontraron diferencias en cuanto a la producción de espermatozoides X e Y, y los resultados de los embriones de PGD, donde observamos un incremento significativo de embriones de sexo femenino; así que imaginamos que debía de existir algo entre estos dos procesos que pudiera estar generando esta disparidad, y pensamos en la capacitación, ya que corresponde a la alícuota de semen utilizada para los procesos de reproducción asistida. Así, que dado a que obtuvimos resultados suficientemente relevantes, decidimos no aumentar más la “n” de este grupo.

En esta parte del estudio, realizado en donantes de fertilidad probada, la concentración y la movilidad progresiva fueron similares en los 3 grupos, tanto en las muestras en fresco como después de capacitar, observándose solo un ligero daño en la morfología de los hombres muy fumadores (datos procedentes de la experimentación no reflejados en la tabla), pero la diferencia no resultó significativa.

Además, hay muchas controversias respecto a la capacidad que pueda tener el swim-up para modificar *per se* el ratio Y:X de los espermatozoides. Algunos autores no han observado ningún cambio en esta proporción luego del enriquecimiento de espermatozoides móviles por swim-up (Han y cols. 1993, Lobel y cols. 1993, Samura y cols. 1997). En contraste, otros estudios han descrito un incremento en la proporción de espermatozoides que llevan el cromosoma Y tras el swim-up (De Jonge y cols. 1997, Jakab y cols. 2003, Li y Hoshiai. 1998). En este estudio, en las alícuotas procesadas por swim-up se encontró un enriquecimiento significativo de espermatozoides portadores del cromosoma X en el grupo de donantes muy fumadores comparado con los no fumadores.

---

Por otra parte, se ha sugerido que el hábito de fumar del hombre puede dar a lugar efectos deletéreos en el desarrollo embrionario preimplantación, especialmente tras el ICSI (Zitzmann y cols. 2003). Sin embargo, en esta investigación no se han observado diferencias significativas con respecto a las tasas de fecundación, desarrollo embrionario o porcentaje de embriones anormales en los 3 grupos analizados.

Por tanto, respecto a los estudios citogenéticos realizados, por un lado, se ha demostrado que el tabaco no afecta directamente a la producción de los espermatozoides portadores de los cromosoma X o Y; sin embargo, éste “parece” tener un efecto de deterioro sobre el espermatozoide portador del cromosoma Y. Por otro lado, en trabajos anteriores ha sido descrito que el swim-up incrementa la proporción de espermatozoides de buena morfología (Englert y cols. 1992, Menkveld y cols. 1990); no obstante, nosotros no observamos un incremento significativo en la morfología normal tras la técnica de swim-up (ni en el grupo de fumadores ni en el de no fumadores), pero sí un incremento en la proporción de los espermatozoides portadores del cromosoma X en el grupo de hombres muy fumadores, lo que podría dar respuesta a los resultados que obtuvimos en los embriones de los hombres muy fumadores (mayor incidencia de embriones de sexo femenino). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores hechos en RNV, que demuestran que el consumo de cigarrillos por parte del padre, más que de la madre, podría estar contribuyendo a la disminución del sex ratio XY:XX (Fukuda y cols. 2002). Analizando estos resultados se puede conjeturar que, el procesamiento del semen en el laboratorio por swim-up u otros métodos es comparable con el proceso de capacitación y a la activación de los espermatozoides observado en el tracto genital femenino. Por ello, no sorprendería el encontrar fenómenos similares *in vivo* e *in vitro*; por lo tanto los resultados de este estudio pudieran, (sin

afán de especular), en cierta forma, tener implicaciones para la población en general y no solamente para los pacientes de ICSI incluidos en este estudio.

***Aneuploidías en espermatozoides:***

Se ha propuesto que el consumo de tabaco puede afectar negativamente la segregación cromosómica, con un aumento en la incidencia de aneuploidías para los cromosomas sexuales (Rubes y cols. 1998, Shi y Martin. 2000), pero no de espermatozoides diploides (Rubes y cols. 1998). Otros autores han encontrado un aumento en la incidencia de disomías para el cromosoma 13, pero no para los cromosomas sexuales y el 21 (Shi y cols. 2001). Mientras que Robbins y cols. (1997), observaron que podría haber una asociación entre el fumar cigarrillos y el incremento de disomías XX, pero no se estableció una relación significativa. En este estudio no se han observado diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de espermatozoides disómicos y diploides entre los 3 grupos, para los cromosomas analizados. Estos resultados podrían deberse a las poblaciones incluidas en cada estudio: hombres fértiles o con parámetros seminales normales en los trabajos anteriores y parejas infértiles de un ciclo de DGP en éste, en donde existe una población bastante homogénea. Así, se observó que el hecho de incluir un factor dañino externo como el cigarrillo, no añadía alteraciones con respecto a la incidencia de aneuploidías en estos pacientes.

***Fragmentación del ADN:***

Las alteraciones en el material genético pueden incluir, además de aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide, tanto una descondensación nuclear como roturas en el ADN. Recientemente, la integridad del ADN del espermatozoide se está reconociendo como una medida independiente de su calidad; y se ha demostrado que ésta puede



afectar la fertilidad *in vivo* e *in vitro* (Muriel y cols. 2006a). La causa de la infertilidad en varones con parámetros seminales normales se podría relacionar con la presencia de un ADN anormal en el espermatozoide.

La evaluación de la integridad del ADN en el espermatozoide, además del estudio de los parámetros sistemáticos seminales, podría aportar una información adicional acerca de la calidad del espermatozoide, que podría resultar de gran ayuda a la hora orientar a las parejas infértiles.

Los resultados de este estudio concernientes a la fragmentación en el ADN del espermatozoide sostienen que hay un incremento significativo en la incidencia de células espermáticas con las hebras de ADN rotas en los hombres fumadores luego de evaluar las muestras procesadas por swim-up.

Primero se realizó la prueba de SCD en las muestras de semen en fresco y el resultado de la fragmentación del ADN en los 3 grupos de hombres estudiados de acuerdo al consumo de cigarrillos por día, fue comparable. Sergerie y cols. (2005), describieron la no asociación entre tabaco y fragmentación de ADN espermático en muestras de semen en fresco de hombres sanos (no infértiles); mientras Saleh y cols. (2002a), estudiaron esta asociación en hombres infértiles y reportaron que las diferencias entre fumadores y no fumadores no eran estadísticamente significativa. No obstante, advirtieron que las muestras de semen de los hombres infértiles fumadores tenían altos niveles de estrés oxidativo (OS) respecto a los no fumadores. Esto fortalece los resultados del presente trabajo y refuerza la hipótesis que el efecto ejercido por algunos factores perjudiciales, que afectan los gametos masculinos, podrían estar encubiertos en el eyaculado, siendo los mismos apreciables solo en la selección de espermatozoides por swim-up.

Se debe recalcar que las muestras empleadas en cualquier TRA están previamente procesada en el laboratorio con la finalidad de eliminar las células no espermáticas y seleccionar los mejores espermatozoides

(mejor movilidad y morfología), imitando así los procesos que ocurren en el tracto reproductor femenino en condiciones naturales. Muratori y cols., (2000) describieron que hasta cierto punto la fragmentación del ADN estaba positivamente relacionada con una morfología anormal en el espermatozoide y asociada con defectos en la cola; pero encontraron una correlación negativa entre ADN roto y movilidad progresiva.

Basándonos en trabajos previos, donde se registró que las tasas de fecundación y algunos indicadores de calidad embrionaria estaban relacionados con el alcance de la fragmentación del ADN espermático post swim-up (Muriel y cols. 2006a); en conjunto con los resultados del actual estudio, se puede concluir que la vía para determinar la fragmentación del ADN parece evidente que debería ser evaluando las alícuotas tras el procesamiento por swim-up.

Con el fin de perfeccionar estos hallazgos, se hicieron comparaciones múltiples entre los 3 grupos estudiados y los resultados antes y después del capacitado; y los resultados indican que los hombres fumadores moderados y muy fumadores presentan un número significativamente mayor de células espermáticas con ADN dañado tras el capacitado que los no fumadores. Es más, los hombres no fumadores tuvieron una disminución significativa de células espermáticas degradadas (CD) y en general menos espermatozoides con ADN deteriorado.

Estudios previos sobre fragmentación del ADN espermático y consumo de tabaco, han sido realizados independientemente en semen en fresco (Saleh y cols. 2002b, Sergerie y cols. 2000) o semen capacitado (Belcheva y cols. 2004, Sun y cols. 1997, Younglai y cols. 2001), pero anteriormente no se ha realizado un diseño como el de este trabajo donde se han comparado las muestras antes y después del capacitado e introduciendo un factor externo.

Respecto al procesamiento en el laboratorio, algunos estudios han analizado la relevancia de la preparación del semen en el porcentaje de

células con ADN fragmentado. La técnica de swim-up para el capacitado de espermatozoides móviles ha sido estudiada por Younglai y cols. (2001), en hombres que asisten a una clínica de infertilidad, con el fin de determinar si este procedimiento puede ocasionar efectos perjudiciales en el ADN espermático; y encontraron que no existían diferencias significativas entre la fragmentación del ADN en la muestra fresca y en la procesada por swim-up y por el método de swim-up; pero en el mismo, no se estudió ningún factor perjudicial externo como por ejemplo el consumo de tabaco (en este caso).

Al igual que en este trabajo, Sun y cols. (1997) describieron un incremento en la fragmentación del ADN espermático entre hombres infértiles (fumadores y no fumadores) tras procesamiento por swim-up que pudiera sugerir un posible vínculo con las toxinas ambientales. Otros estudios llevados a cabo por Belcheva y cols. (2004), en donantes normozoospermicos antes de la capacitación por gradientes de Percoll, concluyeron que la fragmentación del ADN en espermatozoides de donantes sanos fumadores (no infértiles) permanecía dentro del rango normal. Sin embargo, ellos observaron que el fumar cigarrillos inducía un deterioro en la membrana plasmática de las células espermáticas.

En conclusión, el análisis de la fragmentación del ADN en las muestras de eyaculado podría ocultar el efecto perjudicial real del tabaco, al igual que se observó con la proporción de espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y, ya que de manera similar, no se han encontrado diferencias con respecto al consumo de tabaco en las muestras en fresco

Sino es luego, en el capacitado, donde realmente se puede detectar el efecto perjudicial producido por el tabaco. Este efecto deletéreo está afectando la selección espermática por la interferencia en el proceso del swim-up, demostrando que el tabaco, altera selectivamente la capacitación del semen por swim-up en los hombres fumadores. Las bases celulares y moleculares de este fenómeno quedan aún por elucidar; pero

se pueden plantear algunas posibles hipótesis, como: a) que la fragmentación del ADN (como proceso continuo) se produzca también luego del eyaculado, estando incrementado en los pacientes fumadores y subsecuentemente las células que están algo fragmentadas (como por ejemplo las de halo mediano) terminen fragmentándose completamente tras la incubación durante 45 min. que dura el proceso de capacitado; b) esta observación luego del capacitado no significa que este proceso esté aumentando los espermatozoides fragmentados en los fumadores, pero posiblemente si esté seleccionando mejor los espermatozoides no fragmentados en los no fumadores. La suma de ambos efectos se traduce en esa diferencia significativa post swim-up. Basándonos en estas evidencias, es aconsejable que los hombres que son atendidos por infertilidad en TRA o que buscan descendencia eviten el consumo de tabaco.

***Sistema antioxidante: sistema glutatión:***

Fundamentándonos en el trabajo previo de Saleh y *col.* (2002c), quienes hallaron diferencias, aunque no significativas, en la fragmentación del ADN de los hombres fumadores, pese a observar que los hombres infértiles fumadores tenían altos niveles de estrés oxidativo (OS), así como en nuestros propios resultados de fragmentación del ADN en los fumadores, se planteó estudiar algunas enzimas que juegan un papel importante en el sistema de oxido-reducción a nivel del espermatozoide.

Es conocido que los espermatozoides, son particularmente vulnerables al estrés oxidativo ya que su membrana plasmática es rica en ácidos grasos polinsaturados. Para proteger al espermatozoide del daño oxidativo, tiene que existir una cantidad adecuada de ROS que se mantiene a través de un balance entre los ROS generados durante la maduración espermática en el epidídimo y los antioxidantes en las secreciones del tracto genital masculino (O y cols. 2006).

En este estudio se observó una disminución significativa de la expresión de todas las enzimas (GPx-1, GPx-4 y GR), sin embargo el hallazgo más relevante del mismo es la notable disminución de la actividad de la GPx-4 en los hombres fumadores, ya que ésta es una isoforma específica del espermatozoide que se encuentra en niveles muy elevados en el testículo y cuya deficiencia se ha relacionado recientemente con la infertilidad masculina (Foresta y cols. 2002, Garrido y cols. 2004a, Imai y cols. 2001), así como también con la morfología anormal de los espermatozoides (Garrido y cols. 2004b) y alteración en la morfología embrionaria (Meseguer y cols. 2006). En relación a este trabajo partimos de una población homogénea ya con problemas de infertilidad, por lo que podemos concluir que la expresión de ARNm de la transcripción específica del espermatozoide así como de la actividad enzimática se deba al efecto nocivo de los compuestos del cigarrillo en los hombres fumadores; y por tanto en estos pacientes hay poca actividad de la GR, que es la enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado, por tanto no es de extrañar que se observe menor cantidad de glutatión reducido (GSH) en los hombres fumadores con respecto a los no fumadores, aunque esta diferencia no haya resultado significativa. Esta disminución en la cantidad de GSH en la célula (la cual es necesaria para ser utilizada por la GPx en la eliminación de los peróxidos y lipoperóxidos), aunado a la propia disminución en la actividad de la GPx-4, supondría un aumento en los niveles de ROS.

Algunos autores han descrito que una posible fuente de RL son los leucocitos seminales (Meseguer y cols. 2007, Potts y Pasqualotto. 2003, Tortolero y cols. 2004) y que el grado de daño espermático inducido por los ROS depende de la localización de la reacción inflamatoria, de la duración de la exposición del espermatozoide a estos productos y de la capacidad de la célula espermática de activar su sistema intrínseco de defensa (Everaert y cols. 2003). Saleh y col.

(2002), estudiaron un grupo de hombres infértiles y observaron que en los fumadores había niveles significativamente elevados de de leucocitos seminales en comparación con aquellos que no fumaban ( $p=0,01$ ), y con donantes fértiles como grupo control ( $p=0,006$ ); sin embargo, en este estudio se llevó a cabo una selección de la población y se excluyeron aquellas muestras que presentaban leucospermia, por lo tanto, se puede descartar la reacción inflamatoria como posible fuente de radicales libres y por ende del estrés oxidativo que podría inhibir la acción de reacciones enzimáticas.

***Daño oxidativo al ADN espermático:***

Oger y cols. (2003), han estudiado en pacientes infértiles, los niveles de 8-hidroxi-deoxiguanosina (uno de los productos oxidativos del ADN espermático) y los han comparado con el índice de fragmentación del ADN, observando una relación positiva y concluyendo que una de las causas de la fragmentación del ADN espermático son los productos generados de la oxidación. No obstante, en el presente estudio, se ha podido observar que no existe una relación directa entre el consumo de tabaco y un mayor daño oxidativo al ADN espermático, ya que el porcentaje de oxidación en ambos grupos, tanto en muestras de eyaculado como capacitadas han sido comparables, lo cual podría sugerir que los productos de oxidación generados por el consumo de tabaco son similares a los de la población no fumadora, y podría indicarnos que probablemente el daño en la integridad del ADN espermático que se observó en estudios preliminares en los hombres fumadores, se deba a productos del cigarrillo procedentes de otra reacción distinta a la oxidación.

En líneas generales, los resultados de este estudio sugieren que el sistema de defensa primario del espermatozoide se encuentra afectado a causa del cigarrillo, ya que hallamos una disminución

significativa de la actividad y la expresión de la GPx-4, sin embargo, el daño oxidativo provocado en los hombres fumadores como resultado primario de la acción de los radicales libres sobre éste, no llega a ser lo suficientemente elevado como para causar daños en el ADN espermático; por lo que podemos inferir que se descarta la hipótesis planteada concerniente a este punto, que la oxidación podría ser una posible causa potencial de la fragmentación del ADN espermático observada en estos pacientes.

A pesar de que hay evidencia y se han demostrado los cambios que induce el cigarrillo sobre la función reproductiva y sobre el espermatozoide, y de la gran cantidad de datos disponibles en la literatura; el mecanismo por el cual el cigarrillo afecta la fertilidad, así como también los agentes químicos responsables sigue sin elucidarse por completo. Sin embargo, de los cientos de sustancias químicas presentes en el humo del cigarrillo, la mayoría de la investigación se ha focalizado en la nicotina (Younglai y cols. 2005). Por lo tanto nos queda continuar indagando otros estudios moleculares que nos ayuden a entender este aparentemente simple pero a la vez complejo sistema que gira alrededor del espermatozoide humano. Por el momento solo queda mantener la propuesta a los clínicos en reproducción humana de desaconsejar el consumo de cigarrillo a los pacientes que buscan descendencia.





## **8. CONCLUSIONES**



1) El tabaco no altera los parámetros seminales en los pacientes infértiles; así mismo, son comparables entre si las anomalías cromosómicas en espermatozoides y en embriones provenientes de hombres fumadores con los no fumadores; también lo son, la proporción de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y en muestras de eyaculado.

2) Existe un sesgo importante a nivel cromosómico en los espermatozoides tras la capacitación en los hombres fumadores a favor de aquellos que portan el cromosoma X, que se corresponde con el incremento significativo de embriones de sexo femenino provenientes de este grupo de pacientes, lo que hace inferir que el tabaco tiene efectos deletéreos sobre el espermatozoide portador de cromosoma Y.

3) Al relacionar nivel molecular el efecto del tabaco sobre el espermatozoide; se concluye que:

a) La integridad del ADN de los espermatozoides de los hombres fumadores está significativamente alterada tras el proceso del capacitado con respecto a los hombres que no fumaban.

b) En cuanto a las enzimas destinadas a eliminar los radicales libres, se concluye que el tabaco podría tener un efecto diana específico sobre el espermatozoide, ya que tanto la expresión de la GPX 4 (que está directamente relacionada con la infertilidad) como su actividad, están disminuidas en los hombres fumadores.

c) La fragmentación del ADN debida al consumo de cigarrillo no tiene origen en la oxidación del mismo causada por el tabaco.

Probablemente haya algún otro compuesto en el cigarrillo que no produzca oxidación pero que sea capaz de afectar la integridad del ADN espermático.





## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- Aitken, R.J. and Baker, M.A. (2002) Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int. J. Androl.*, **25**, 191-194.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z. and Irvine, D.S. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **59**, 1037-1046.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, **8**, 338-348.
- Ansari-Lari, M. and Saadat, M. (2002) Changing sex ratio in Iran, 1976-2000. *J. Epidemiol. Community Health*, **56**, 622-623.
- Arabi, M. (2004) Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia*, **36**, 305-310.
- Arabi, M. and Moshtaghi, H. (2005) Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Andrologia*, **37**, 119-124.
- Ballescá JL. (2002) "Estudio del varón estéril". En: *Reproducción Humana 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana*. Madrid; 279-286.
- Belcheva, A., Ivanova-Kicheva, M., Tzvetkova, P. and Marinov, M. (2004) Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int. J. Androl.*, **27**, 296-300.
- Benowitz, N.L., Kuyt, F., Jacob, P., 3rd, Jones, R.T. and Osman, A.L. (1983) Cotinine disposition and effects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **34**, 604-611.
- Bisioli C. (2002) Sex ratio in Artificial Reproductive Technologies (ART): Inadvertent Sex Selection of Differential Investment between Sexes? *MSc Thesis*, University of Leeds, Leeds, UK
- Bisioli, C. (2004) Sex ratio of births conceived during wartime. *Hum. Reprod.*, **19**, 218-9; author reply 219-20.
- Blanco, J., Egozcue, J. and Vidal, F. (1996) Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, **11**, 722-726.
- Chia, S.E., Tay, S.K. and Lim, S.T. (1998) What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum. Reprod.*, **13**, 3394-3398.
- Comhaire, F.H., Christophe, A.B., Zalata, A.A., Dhooge, W.S., Mahmoud, A.M. and Depuydt, C.E. (2000) The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **63**, 159-166.



- Davis, D.L., Gottlieb, M.B. and Stampnitzky, J.R. (1998) Reduced ratio of male to female births in several industrial countries: a sentinel health indicator? *JAMA*, **279**, 1018-1023.
- De Jonge, C. (2002) The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Hum. Fertil. (Camb)*, **5**, 51-53.
- De Jonge, C.J., Flaherty, S.P., Barnes, A.M., Swann, N.J. and Matthews, C.D. (1997) Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil. Steril.*, **67**, 1109-1114.
- de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992a) Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, **13**, 368-378.
- de Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992b) Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.*, **13**, 379-386.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N. and Vermeulen, N.P. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 202-226.
- Dube MF and Green CR. (1982) Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv. Tobacco Sci.*, **8**, 42-102.
- Dubrovskaya, V.A. and Wetterhahn, K.E. (1998) Effects of Cr(VI) on the expression of the oxidative stress genes in human lung cells. *Carcinogenesis*, **19**, 1401-1407.
- Egozcue, J., Blanco, J. and Vidal, F. (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum. Reprod. Update*, **3**, 441-452.
- Egozcue J. (2002) "Esterilidad masculina de causa genética". En: Reproducción Humana 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid; 309-312.
- Englert, Y., Van den Bergh, M., Rodesch, C., Bertrand, E., Biramane, J. and Legreve, A. (1992) Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, **7**, 399-402.
- Everaert, K., Mahmoud, A., Depuydt, C., Maeyaert, M. and Comhaire, F. (2003) Chronic prostatitis and male accessory gland infection—is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)? *Andrologia*, **35**, 325-330.
- Fernandez, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J.G. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.*, **24**, 59-66.
- Foresta, C., Flohe, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F. and Maiorino, M. (2002) Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione

- peroxidase. *Biol. Reprod.*, **67**, 967-971.
- Fraczek, M. and Kurpisz, M. (2005) The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, **59**, 523-534.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M. and Ames, B.N. (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.*, **351**, 199-203.
- Fukuda, M., Fukuda, K., Shimizu, T., Andersen, C.Y. and Byskov, A.G. (2002) Parental periconceptional smoking and male: female ratio of newborn infants. *Lancet*, **359**, 1407-1408.
- Fukuda, M., Fukuda, K., Shimizu, T. and Moller, H. (1998) Decline in sex ratio at birth after Kobe earthquake. *Hum. Reprod.*, **13**, 2321-2322.
- Gandini, L., Lombardo, F., Lenzi, A., Culasso, F., Pacifici, R., Zuccaro, P. and Dondero, F. (1997) The in-vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Hum. Reprod.*, **12**, 727-733.
- Garrido, N., Meseguer, M., Simón, C., Pellicer, A. and Remohí, J. (2002) Factor masculino y técnicas de reproducción asistida. *Revista de ASEBIR*, **7**(1):10-24
- Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004a) Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, **82 Suppl 3**, 1059-1066.
- Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004b) Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.*, **6**, 59-65.
- Griffin, D.K., Abruzzo, M.A., Millie, E.A., Sheean, L.A., Feingold, E., Sherman, S.L. and Hassold, T.J. (1995) Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 2227-2232.
- Han, T.L., Flaherty, S.P., Ford, J.H. and Matthews, C.D. (1993) Detection of X- and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil. Steril.*, **60**, 1046-1051.
- Heron, J., Ness, A. and ALSPAC (avon longitudinal study of parents and children) Study Team (2004) Lack of association between smoking behavior and the sex ratio of offspring in the avon longitudinal study of parents and children. *Fertil. Steril.*, **81**, 700-702.
- Herrero, M.B. and Gagnon, C. (2001) Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J. Androl.*, **22**, 349-356.
- Hinsch, E., Aires, V.A., Hedrich, F., Oehninger, S. and Hinsch, K.D. (2005) A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated

- acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology*, **63**, 1682-1694.
- Holzki, G., Gall, H. and Hermann, J. (1991) Cigarette smoking and sperm quality. *Andrologia*, **23**, 141-144.
- Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M. and Nakagawa, Y. (2001) Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.*, **64**, 674-683.
- Internacional Agency for Research on Cancer. (1986) Tobacco smoking. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals in humans*. Vol. 38. Lyon, France, pp. 47-81
- Jakab, A., Kovacs, T., Zavaczki, Z., Borsos, A., Bray-Ward, P., Ward, D. and Huszar, G. (2003) Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. *Hum. Reprod.*, **18**, 1481-1488.
- Jose-Miller, A.B., Boyden, J.W. and Frey, K.A. (2007) Infertility. *Am. Fam. Physician*, **75**, 849-856.
- Kemal Duru, N., Morshedi, M. and Oehninger, S. (2000) Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, **74**, 1200-1207.
- Kruger, T.F. and Coetzee, K. (1999) The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum. Reprod. Update*, **5**, 172-178.
- Kunzle, R., Mueller, M.D., Hanggi, W., Birkhauser, M.H., Drescher, H. and Bersinger, N.A. (2003) Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.*, **79**, 287-291.
- Lewis, S.E. (2007) Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*, **134**, 31-40.
- Li, P. and Hoshiai, H. (1998) Detection of numerical chromosome abnormalities in human spermatozoa by three-color fluorescence in situ hybridization. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **24**, 385-392.
- Lobel, S.M., Pomponio, R.J. and Mutter, G.L. (1993) The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. *Fertil. Steril.*, **59**, 387-392.
- Mak, V., Jarvi, K., Buckspan, M., Freeman, M., Hechter, S. and Zini, A. (2000) Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology*, **56**, 463-466.
- Martini, A.C., Molina, R.I., Estofan, D., Senestrari, D., Fiol de Cuneo, M. and Ruiz, R.D. (2004) Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil. Steril.*, **82**, 374-377.
- Menkveld, R., Swanson, R.J., Kotze, T.J. and Kruger, T.F. (1990) Comparison of a discontinuous Percoll gradient method versus a swim-up method: effects on sperm morphology and other semen parameters.

- Andrologia*, **22**, 152-158.
- Merino, G., Lira, S.C. and Martinez-Chequer, J.C. (1998) Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch. Androl.*, **41**, 11-15.
- Meseguer, M., de los Santos, M.J., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J. and Garrido, N. (2006) Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil. Steril.*, **86**, 1376-1385.
- Meseguer, M., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004) Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **21**, 445-451.
- Meseguer, M., Garrido, N., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Martinez-Jabaloyas, J.M. and Gil-Salom, M. (2003) Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum. Reprod.*, **18**, 1281-1285.
- Meseguer, M., Garrido, N., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2004) Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *J. Androl.*, **25**, 773-780.
- Meseguer, M., Martinez-Conejero, J.A., O'Connor, J.E., Pellicer, A., Remohi, J. and Garrido, N. (2007) The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil. Steril.*
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N. and Fernandez, J. L. (2007 in press). The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test *Fertil. Steril*
- Mills, J.L., England, L., Granath, F. and Cnattingius, S. (2003) Cigarette smoking and the male-female sex ratio. *Fertil. Steril.*, **79**, 1243-1245.
- Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Ferrari, E., Patterson, D.G., Jr, Kieszak, S.M., Brambilla, P., Vincoli, N., Signorini, S., Tramacere, P., Carreri, V., et al (2000) Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*, **355**, 1858-1863.
- Moller, H. (1996) Change in male:female ratio among newborn infants in Denmark. *Lancet*, **348**, 828-829.
- Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J., Jr and Agarwal, A. (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod.*, **19**, 129-138.
- Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P.,

- Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G., et al (2000) Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J. Androl.*, **21**, 903-912.
- Muriel, L., Garrido, N., Fernandez, J.L., Remohi, J., Pellicer, A., de los Santos, M.J. and Meseguer, M. (2006a) 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.*, **85**, 371-383.
- Muriel, L., Meseguer, M., Fernandez, J.L., Alvarez, J., Remohi, J., Pellicer, A. and Garrido, N. (2006b) Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum. Reprod.*, **21**, 738-744.
- National Center for Biotechnology Information.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- O, W.S., Chen, H. and Chow, P.H. (2006) Male genital tract antioxidant enzymes--their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **250**, 80-83.
- Oger, I., Da Cruz, C., Panteix, G. and Menezo, Y. (2003) Evaluating human sperm DNA integrity: relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the sperm chromatin structure assay. *Zygote*, **11**, 367-371.
- Oldereid, N.B., Rui, H., Clausen, O.P. and Purvis, K. (1989) Cigarette smoking and human sperm quality assessed by laser-Doppler spectroscopy and DNA flow cytometry. *J. Reprod. Fertil.*, **86**, 731-736.
- Oliva, A., Spira, A. and Multigner, L. (2001) Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum. Reprod.*, **16**, 1768-1776.
- Pacifici, R., Altieri, I., Gandini, L., Lenzi, A., Pichini, S., Rosa, M., Zuccaro, P. and Dondero, F. (1993) Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther. Drug Monit.*, **15**, 358-363.
- Pflieger-Bruss, S., Schuppe, H.C. and Schill, W.B. (2004) The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia*, **36**, 337-345.
- Pomerol J. (2002) "Varicocele e infertilidad". En: *Reproducción Humana 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana*. Madrid; 303-308.
- Potts, J.M. and Pasqualotto, F.F. (2003) Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia*, **35**, 304-308.
- Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J. and Jefferies, T.M. (1999) Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.*, **423**, 103-111.
- Robbins, W.A., Baulch, J.E., Moore, D., 2nd, Weier, H.U., Blakey, D. and Wyrobek, A.J. (1995) Three-probe fluorescence in

- situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 799-809.
- Robbins, W.A., Meistrich, M.L., Moore, D., Hagemester, F.B., Weier, H.U., Cassel, M.J., Wilson, G., Eskenazi, B. and Wyrobek, A.J. (1997) Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat. Genet.*, **16**, 74-78.
- Robbins, W.A., Segraves, R., Pinkel, D. and Wyrobek, A.J. (1993) Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, 799-807.
- Robbins, W.A., Vine, M.F., Truong, K.Y. and Everson, R.B. (1997) Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, 175-183.
- Rodrigo, L., Rubio, C., Mateu, E., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A. and Gil-Salom, M. (2004) Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, **19**, 118-123.
- Rodríguez M, Gil-Salom M, Castellón G and Remohí J. (2005) Diagnóstico y conducta a seguir en el varón. En: *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Mc Gaw-Hill Interamericana. Primera parte, cap 6:67
- Romero, F.J., Martínez-Blasco, A., Bosch-Morell, F., Marin, N., Trenor, C. and Roma, J. (1999) Glycemic control and not protein kinase C inhibition prevents the early decrease of glutathione peroxidase activity in peripheral nerve of diabetic mice. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **4**, 265-269.
- Rosa, M., Pacifici, R., Altieri, I., Pichini, S., Ottaviani, G. and Zuccaro, P. (1992) How the steady-state cotinine concentration in cigarette smokers is directly related to nicotine intake. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 324-329.
- Rubes, J., Lowe, X., Moore, D., 2nd, Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., Selevan, S.G. and Wyrobek, A.J. (1998) Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil. Steril.*, **70**, 715-723.
- Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi, J. and Pellicer, A. (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum. Reprod.*, **18**, 182-188.
- Saaranen, M., Suonio, S., Kauhanen, O. and Saarikoski, S. (1987) Cigarette smoking and semen quality in men of reproductive age. *Andrologia*, **19**, 670-676.
- Sakamoto, M., Nakano, A. and Akagi, H. (2001) Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury

- pollution. *Environ. Res.*, **87**, 92-98.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R. and Thomas, A.J., Jr (2002a) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.*, **78**, 491-499.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R. and Thomas, A.J., Jr (2002b) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.*, **78**, 491-499.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R. and Thomas, A.J., Jr (2002c) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.*, **78**, 491-499.
- Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E. and Ohama, K. (1997) Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum. Reprod.*, **12**, 2437-2442.
- Sanocka, D., Jedrzejczak, P., Szumala-Kaekol, A., Fraczek, M. and Kurpysz, M. (2003) Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J. Androl.*, **24**, 448-455.
- Sarraf M, Ghazzawi I and Hawani S. (1997) ICSI: are we altering sex ratio? *Hum Reprod.* **12** (Abstract Book 1), 29 (abstract O-063).
- Sergerie, M., Bleau, G., Teule, R., Daudin, M. and Bujan, L. (2005) Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, **33**, 89-101.
- Sergerie, M., Ouhilal, S., Bissonnette, F., Brodeur, J. and Bleau, G. (2000) Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum. Reprod.*, **15**, 1314-1321.
- Shen, H.M., Chia, S.E., Ni, Z.Y., New, A.L., Lee, B.L. and Ong, C.N. (1997) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 675-680.
- Shen, H.M., Chia, S.E. and Ong, C.N. (1999) Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J. Androl.*, **20**, 718-723.
- Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M. and Al-Sawaf, H. (2005) Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr. Drug Metab.*, **6**, 495-501.
- Shi, Q., Ko, E., Barclay, L., Hoang, T., Rademaker, A. and Martin, R. (2001) Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **59**, 417-421.
- Shi, Q. and Martin, R.H. (2000) Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet. Cell Genet.*, **90**, 219-226.

- Sofikitis, N., Miyagawa, I., Dimitriadis, D., Zavos, P., Sikka, S. and Hellstrom, W. (1995) Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J. Urol.*, **154**, 1030-1034.
- Solak, Z.A., Kabaroglu, C., Cok, G., Parildar, Z., Bayindir, U., Ozmen, D. and Bayindir, O. (2005) Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin. Exp. Med.*, **5**, 99-105.
- Strickler, R.C., Keller, D.W. and Warren, J.C. (1975) Artificial insemination with fresh donor semen. *N. Engl. J. Med.*, **293**, 848-853.
- Sun, J.G., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, **56**, 602-607.
- Tapia, R., Rojas J. (2003) Semiología del análisis de semen. Vol. XVIII, Núm. 2 Abril-Junio pp 48-52
- Tortolero, I., Duarte Ojeda, J.M., Pamplona Casamayor, M., Alvarez Gonzalez, E., Arata-Bellabarba, G., Regadera, J. and Leiva Galvis, O. (2004) The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. *Arch. Esp. Urol.*, **57**, 921-928.
- Trummer, H., Habermann, H., Haas, J. and Pummer, K. (2002) The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.*, **17**, 1554-1559.
- Vidal, F., Moragas, M., Catala, V., Torello, M.J., Santalo, J., Calderon, G., Gimenez, C., Barri, P.N., Egozcue, J. and Veiga, A. (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum. Reprod.*, **8**, 1740-1743.
- Vine, M.F. (1996) Smoking and male reproduction: a review. *Int. J. Androl.*, **19**, 323-337.
- Vine, M.F., Hulka, B.S., Margolin, B.H., Truong, Y.K., Hu, P.C., Schramm, M.M., Griffith, J.D., McCann, M. and Everson, R.B. (1993) Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am. J. Public Health*, **83**, 1335-1338.
- Vine, M.F., Margolin, B.H., Morrison, H.I. and Hulka, B.S. (1994) Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil. Steril.*, **61**, 35-43.
- Vine, M.F., Tse, C.K., Hu, P. and Truong, K.Y. (1996) Cigarette smoking and semen quality. *Fertil. Steril.*, **65**, 835-842.
- Wang, S.L., Wang, X.R., Chia, S.E., Shen, H.M., Song, L., Xing, H.X., Chen, H.Y. and Ong, C.N. (2001) A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J. Androl.*, **22**, 73-78.
- Wentz, A.C. (1986) Cigarette smoking and infertility. *Fertil. Contracept.*, **46**, 365-367.
- Wong, W.Y., Thomas, C.M., Merkus,



- H.M., Zielhuis, G.A., Doesburg, W.H. and Steegers-Theunissen, R.P. (2000) Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil. Steril.*, **74**, 930-935.
- World Health Organization. (1997) Tobacco or Health. A Global Status Report. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wynder E.L. and Hoffmann D. (1997) Tobacco and tobacco smoke-studies in experimental carcinogenesis. *Academic Press*, New York, USA.
- World Health Organization (2001) Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **37**, I-XII, 1-123.
- Wyrobek, A.J., Alhborn, T., Balhorn, R., Stanker, L. and Pinkel, D. (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol. Reprod. Dev.*, **27**, 200-208.
- Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E. and Ong, C.N. (2003) The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat. Res.*, **534**, 155-163.
- Younglai, E.V., Holloway, A.C. and Foster, W.G. (2005) Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Hum. Reprod. Update*, **11**, 43-57.
- Younglai, E.V., Holt, D., Brown, P., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (2001) Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, **16**, 1950-1953.
- Zavos, P.M., Correa, J.R., Antypas, S., Zarmakoupis-Zavos, P.N. and Zarmakoupis, C.N. (1998) Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertil. Steril.*, **69**, 425-429.
- Zenzes, M.T. (2000) Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, **6**, 122-131.
- Zenzes, M.T., Puy, L.A., Bielecki, R. and Reed, T.E. (1999) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 125-131.
- Zitzmann, M., Rolf, C., Nordhoff, V., Schrader, G., Rickert-Fohring, M., Gassner, P., Behre, H.M., Greb, R.R., Kiesel, L. and Nieschlag, E. (2003) Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, **79** **Suppl 3**, 1550-1554.

Zorn, B., Sujur, V., Stare, J. and Meden-Vrtovec, H. (2002) Decline in sex ratio at birth after 10-day war in Slovenia: brief communication. *Hum. Reprod.*, **17**, 3173-3177.