

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
  - a. Título.
  - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
  - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
  - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
  - e. Introducción.
  - f. Material y métodos.
  - g. Resultados.
  - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
  - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.

En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

# La edad masculina y su relación con los niveles de apoptosis y peroxidación lipídica en espermatozoides de varones que realizan tratamientos de TRA

Cristian Alvarez Sedó,<sup>1,2</sup> Heydy Uriondo Boudri,<sup>1</sup> Serna Janny,<sup>1</sup> Florencia Nodar,<sup>1</sup> Sergio Papier,<sup>1</sup> Claudio Chillik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR).

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación, Biología y Estudios Especializados (LABINEE- CEGyR).

**Reproducción 2012;27:71-78**

## Resumen

*El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar en espermatozoides los niveles de externalización de fosfatidilserina-EPS (apoptosis temprana), caspasa-3 activa, fragmentación del ADN (eventos de apoptosis tardíos) y peroxidación lipídica en relación a la edad de varones que realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. Por otro lado, se buscó determinar si la edad por encima de 46 años se relaciona con el incremento significativo de los niveles de estos marcadores. Para dicho propósito se evaluó el semen de 60 varones para cuantificar los niveles de EPS (Anexina V), caspasa-3 activa (C3A anticuerpo), fragmentación del ADN (TUNEL) y peroxidación lipídica (BODIPY). La fracción móvil*

*de espermatozoides fue obtenida luego de un swim-up. Una fracción del pellet fue incubada con una alícuota de Anexina V (AnV) para evaluar la EPS y peroxidación lipídica (BODIPY). La fracción restante fue fijada y procesada para la evaluación de C3A por inmunocitoquímica (ICQ) y TUNEL. En la población estudiada, los niveles de AnV, C3A, TUNEL y BODIPY fueron  $17.9 \pm 11.3$ ,  $9.9 \pm 5.1$ ,  $18.6 \pm 13.1$  y  $20.3 \pm 9.3$  respectivamente; encontrándose una correlación positiva con el incremento de la edad ( $r = 0.32 - 0.42$ ). Al comparar los resultados entre varones menores a 45 años versus los mayores de 46, se observó un incremento significativo de los marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica (AnV= 13.8 vs 25.0, C3A = 8.0 vs 13.2, TUNEL = 14.8 vs 28.1 y BODIPY = 16.7 vs 26.5) y una disminución significativa en la movilidad progresiva ( $37.1 \pm 4.6$  vs  $30.2 \pm 4.7$ ).*

**Correspondencia:** Cristian Álvarez Sedó  
Viamonte 1432 CP(1055). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
E-mail: calvarez@cegyr.com

**Palabras claves.** Edad masculina, fragmentación del ADN, apoptosis, peroxidación lipídica.

## Male age and its relationship with sperm apoptosis and lipid peroxidation levels in ART patients

### Summary

*The objective of this study was to assess sperm levels of phosphatidylserine externalization -EPS (early apoptosis), cleaved caspase-3 - DNA fragmentation (late apoptosis events) and lipid peroxidation in relation to male age. Furthermore, we wanted to determine if male age above 46 years old is related with a significant increase of these markers. For this purpose, we evaluated 60 semen samples to quantify the levels of EPS (Annexin V), cleaved caspase-3 (C3A antibody), DNA fragmentation (TUNEL) and lipid peroxidation (BODIPY). Sperm motile fraction was obtained after swim-up technique. A sperm fraction was incubated separately with Annexin V (AnV) and BODIPY to assess EPS and lipid peroxidation, respectively. The remaining fraction was fixed and processed for immunocytochemistry (C3A) and TUNEL evaluation. In our population, levels of AnV, C3A, TUNEL and BODIPY were  $17.9 \pm 11.3$ ,  $9.9 \pm 5.1$ ,  $18.6 \pm 13.1$  and  $20.3 \pm 9.3$  respectively. A positive correlation with increasing age was found ( $r = 0.32$  to  $0.42$ ,  $p < 0.05$ ). Comparing the results between men under 45 years versus those older than 46, we observed a significant increase of apoptosis and lipid peroxidation markers (AnV = 13.8 vs. 25.0, C3A = 8.0 vs. 13.2, TUNEL = 14.8 vs. 28.1 and BODIPY = 16.7 vs. 26.5), and a significant decrease of sperm progressive motility ( $37.1 \pm 4.6$  vs.  $30.2 \pm 4.7$ ) was also visualized. We conclude that there is positive correlation between apoptotic markers and lipid peroxidation with increasing age, being significantly higher in men older than 46 years of age.*

**Key words.** Male age, DNA fragmentation, apoptosis, lipid peroxidation.

### Introducción

En el marco de la infertilidad se conoce que alrededor del 30% de los casos son a consecuencia del factor masculino. Años atrás el examen físico y la evaluación del semen (morfología, movilidad, concentración, etc.) han sido aspectos considerados en la toma de conductas médicas dentro de los tratamientos de reproducción asistida. Sin embargo, al parecer estos estudios básicos pueden considerarse insuficientes en casos particulares. Al res-

pecto, incluso con la aparición del ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) como tratamiento frente al factor masculino, aún se puede evidenciar un elevado número de fallas en los ciclos con esta metodología, lo que sugiere que podrían existir otros factores con implicancias clínicas que estarían más allá de lo usualmente estudiado.

El análisis de la fragmentación del ADN aportó nuevas expectativas en la búsqueda de explicación a las fallas repetidas de FIV-ICSI. Se ha descrito la importancia de la estabilidad del núcleo espermático relacionado al éxito reproductivo en humanos. Así, el incremento significativo de los niveles de fragmentación del ADN estaría asociado a bajas tasas de fertilización, implantación embrionaria e incremento de abortos.<sup>1-7</sup>

Tanto factores físicos como metabólicos pueden inducir el daño del ADN espermático. Éste puede ocurrir en la espermatogénesis o durante el tránsito por el epidídimo.<sup>8-11</sup> De igual manera, se han descrito factores de riesgo asociados al incremento de la fragmentación del ADN, tales como: varicocele, criptorquidia, edad avanzada, leucocitospermia, teratozoospermia severa, episodios de fiebre alta, radio y quimioterapia.<sup>12-18</sup>

Se ha reportado que la fragmentación del ADN puede estar asociada a eventos de apoptosis espermática.<sup>17,19-23</sup> Al respecto, se han detectado y descrito marcadores de apoptosis en espermatozoides humanos, como: externalización de fosfatidilserina, caspasa 3 activa, p53, etc.<sup>24-29</sup>

Existe una relación entre el incremento de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la apoptosis espermática con el consecuente daño del ADN.<sup>7,30-33</sup> El estrés oxidativo ocurre cuando la cantidad de EROs supera la capacidad antioxidante seminal.<sup>31</sup> Los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño inducido por las ERO porque sus membranas plasmáticas contienen grandes cantidades de ácidos grasos poli-insaturados y el citoplasma contiene bajas concentraciones de enzimas reductoras.<sup>32</sup> Esto se suma a que el espermatozoide no dispone de mecanismos para reparar el ADN dañado, siendo el ovocito el encargado de repararlo y muchas veces con poco éxito.<sup>33</sup>

A raíz de los trabajos publicados y de resultados preliminares de nuestro grupo de investigación en relación a la influencia de la edad masculina en el daño molecular del espermatozoide, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si los niveles de apoptosis (externalización de fosfatidilserina-EPS, caspasa 3 activa - C3A, fragmentación

del ADN) y peroxidación lipídica se incrementan a medida que aumenta la edad del varón, así como también busca determinar si los varones mayores a 46 años presentan mayores niveles de apoptosis y peroxidación lipídica al compararlos con varones menores a 45 años.

## Materiales y métodos

### Población

Se evaluó de manera prospectiva los sémenes de 60 varones cuyas edades se encontraban comprendidas entre 28 y 68 años. Todos los varones de este estudio son considerados normo-gonadotróficos (según historia clínica) y realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad. Se excluyeron pacientes con enfermedades urogenitales (varicocele, criptorquidia, etc.), cáncer y oligozoospermia severa (concentración  $< 5 \times 10^6$ /mL). Este estudio se realizó bajo la aprobación del Comité de Ética Institucional.

### Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos, salvo excepciones, fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St Louis, EE.UU.) e *Irvine Scientific* (Santa Ana, CA, EE.UU.). Por otro lado, el anticuerpo primario empleado fue: caspasa-3 activa, un anticuerpo monoclonal específico para la proteína caspasa 3 activa (anticuerpo monoclonal anti-conejo, dilución: 1:100, *Cell Signaling Technology Inc*, Massachusetts, EE.UU.). El anticuerpo secundario empleado fue: 594 anti-conejo (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, EE.UU.).

Se utilizó el *kit Annexin V-FITC Apoptosis Kit* (Abcam plc, Oregon, EE.UU.) para la detección de externalización de fosfatidilserina, y el *In situ cell death detection kit, fluorescein* (*Roche Applied Science*, Mannheim, Alemania) para la detección de fragmentación del ADN (TUNEL).

El ensayo de peroxidación lipídica se realizó mediante la sonda fluorescente *BODIPY*<sup>®</sup>581/591 C11 (*Molecular Probes Inc*, EE.UU.).

### Análisis seminal y preparación de la muestra

Las muestras de semen fueron colectadas por masturbación (abstinencia sexual de 2-4 días). Luego de la licuefacción de la muestra (30-60 minutos), se realizó el análisis seminal y la selección de espermatozoides móviles mediante el proce-

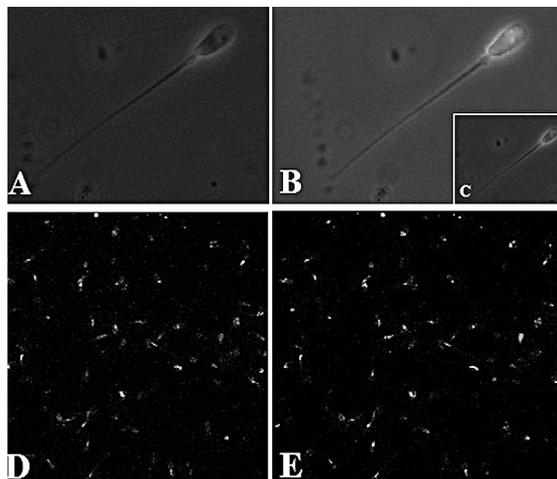
dimiento de *Swim-up* (mHTF *Modified Human Tubal Fluid*, suplementado con 15% de Suero Sintético Substituto-SSS, *Irvine Scientific*) según los procedimientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud.<sup>34</sup>

Una alícuota de la muestra fue utilizada para establecer la morfología espermática según el criterio estricto de Kruger, así como para la evaluación de los niveles de: externalización de fosfatidilserina, caspasa 3 activa, TUNEL y BODIPY.

### Evaluación de peroxidación lipídica (*BODIPY*<sup>®</sup>581/591 C11)

*BODIPY*<sup>®</sup> 581/591 C11 fue agregado a  $2 \times 10^6$  de espermatozoides totales, alcanzando una concentración final de 5  $\mu$ M de BODIPY, y se dejó incubar por 30 minutos a 37° C. Luego se procedió a lavar dos veces agregando 1mL de mHTF-15% SSS centrifugando a 650g por 5 minutos. Como control positivo se emplearon espermatozoides que fueron incubados en mHTF - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) por 24 horas. La evaluación se realizó mediante microscopía de epifluorescencia. Se contabilizaron 500 espermatozoides por muestra. Se consideraron positivos aquellos espermatozoides que presentaron una emisión fluorescente verde (excitación a 488 nm, emisión a 520 nm), (Figura 1).

Figura 1. *BODIPY* 581/591 C11.



Espermatozoides humanos marcados con BODIPY, en donde se muestra: A) Tinción de emisión 560 nm de color rojo, utilizada para el conteo total de espermatozoides; B) Tinción de emisión 520 nm de color verde, para marcación positiva de peroxidación lipídica en la membrana plasmática; C) Unión de ambos canales; D) Marcación positiva en los espermatozoides incubados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM); y E) Unión de los canales rojo y verde.

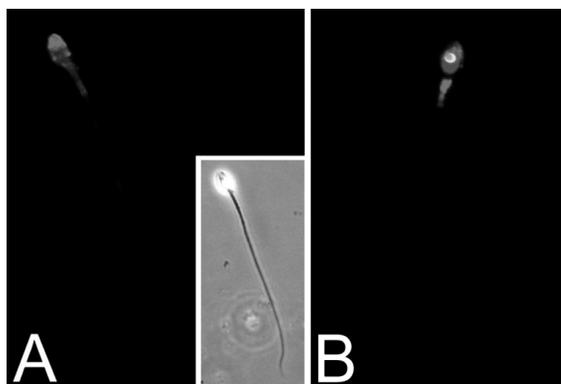
### Evaluación de externalización de fosfatidilserina (EPS)

En una alícuota del *pellet* obtenido se evaluó la EPS mediante el *Annexin V-FITC Apoptosis Kit*. Brevemente se lavó la muestra con PBS y el *pellet* se resuspendió en 500 uL del *buffer* de pegado, se agregó 5 uL de *Annexin V-FITC* y 5 uL de Ioduro de propidio (IP) y se incubó por 5 minutos. La detección fue realizada mediante microscopía de fluorescencia. Se consideró en el estudio a los espermatozoides vivos y apoptóticos (IP<sup>-</sup>/Anexina V<sup>+</sup>) más no las células muertas (IP<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup>) (Figura 2). Se contaron 500 espermatozoides.

### Evaluación de la fragmentación del ADN (TUNEL) y caspasa-3 activa (C3A)

El restante de las muestras se fijó en PBS-Formaldehído al 2%. Seguidamente fueron lavadas y

**Figura 2.** Espermatozoides humanos marcados con Anexina V e Ioduro de propidio.



A) IP-/Annexin V+; y B) IP+/Annexin V+.

permeabilizadas con metanol frío. Se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 0.5% en PBS y se agregó el anticuerpo primario anti-C3A. Luego se agregó el anticuerpo secundario Alexa-Fluor-568 (1:200). Posteriormente se incubó con la solución de TUNEL para finalmente lavar y montar con Vectashield H-1000 (*Vector Laboratories*). Se contaron 500 espermatozoides mediante microscopía de fluorescencia. Los patrones observados son representados en la Figura 3.

### Análisis estadístico

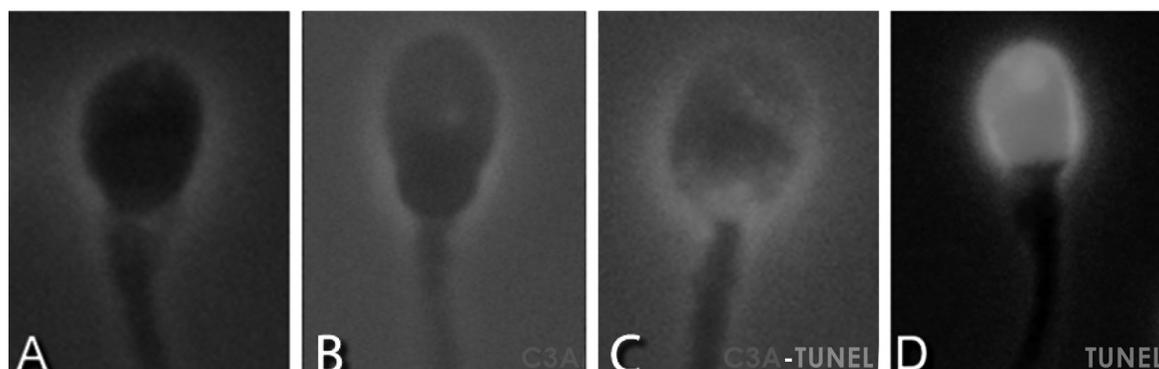
El análisis estadístico se realizó con la prueba de correlación de *Spearman* y las comparaciones entre varones con edades menores a 45 vs mayores a 46 años se realizaron mediante la prueba T de *Student* para muestras desapareadas. Se tomó en cuenta un  $p \leq 0.05$  para establecer diferencias significativas. Se empleó el programa estadístico *MedCalc* 11.6.1 (Bélgica).

### Resultados

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis seminal de las 60 muestras y de los niveles de marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica. En la Figura 4 se muestran los niveles de correlación calculados para los marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica respecto a la edad, en donde en todos los casos se encontró una correlación positiva y significativa ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla 2 se presentan los resultados del

**Figura 3.** ICC de espermatozoides humanos para la detección de C3A y TUNEL:



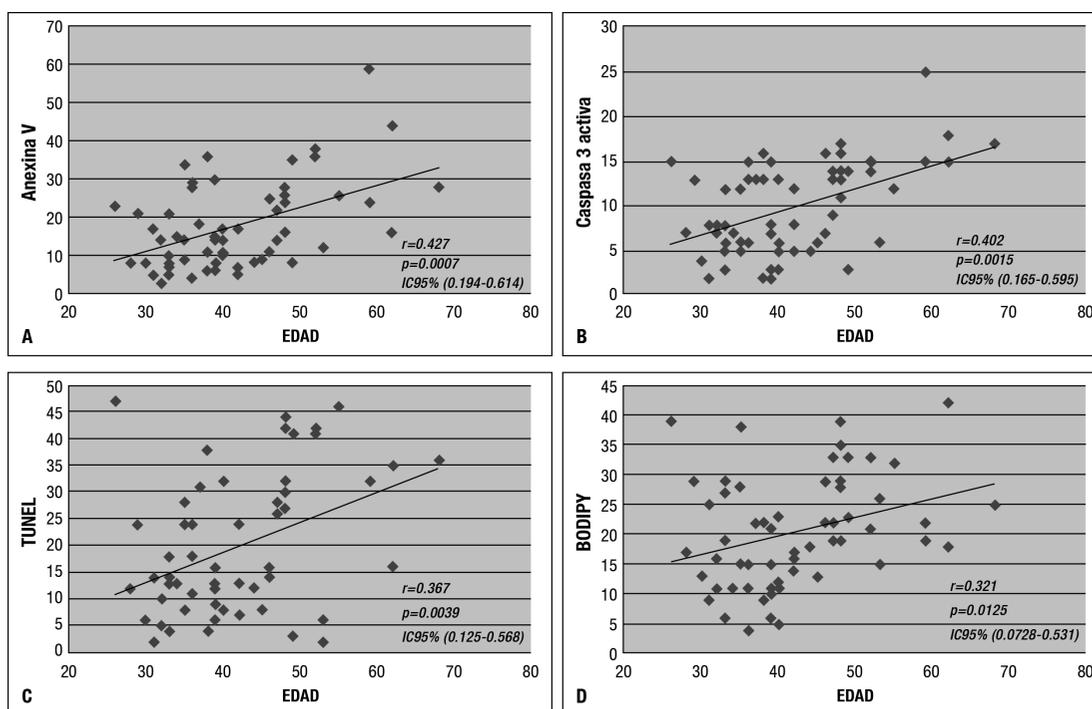
A) Normal, B) C3A+/TUNEL-, C) C3A+/TUNEL+, y D) C3A-/TUNEL+.

análisis seminal, marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica, en los pacientes cuando fueron agrupados según su edad, es decir, aquellos  $\geq 46$  años vs  $\leq 45$  años, encontrándose que los parámetros seminales evaluados no varían significativamente entre las dos poblaciones, exceptuando la movilidad (significativamente menor en los varones  $46 \geq$  años). Los parámetros de apoptosis y el marcador de peroxidación lipídica aumentaron significativamente en el grupo de varones de mayor edad (Figura 5).

**Tabla 1.** Resultados del análisis seminal, marcadores de apoptosis y peroxidación lipídica en la población de 60 pacientes.

| N=60              | X $\pm$ DS      | (Limite Inf-Sup) | IC 95% (de la media) |
|-------------------|-----------------|------------------|----------------------|
| Edad              | 41.9 $\pm$ 9.3  | 26 - 68          | 39.6 - 44.4          |
| Concentración     | 48.7 $\pm$ 22.5 | 8 - 94           | 42.7 - 54.3          |
| Movilidad (a + b) | 34.5 $\pm$ 5.7  | 20 - 45          | 33.1 - 36.1          |
| Morfología        | 6.7 $\pm$ 4.9   | 2 - 23           | 5.4 - 8.0            |
| Anexina V         | 17.9 $\pm$ 11.3 | 3 - 59           | 14.9 - 20.8          |
| Caspasa 3 activa  | 9.9 $\pm$ 5.1   | 2 - 25           | 8.5 - 11.2           |
| TUNEL             | 18.6 $\pm$ 13.1 | 2 - 47           | 16.3 - 23.1          |
| BODIPY            | 20.3 $\pm$ 9.3  | 4 - 42           | 17.9 - 22.7          |

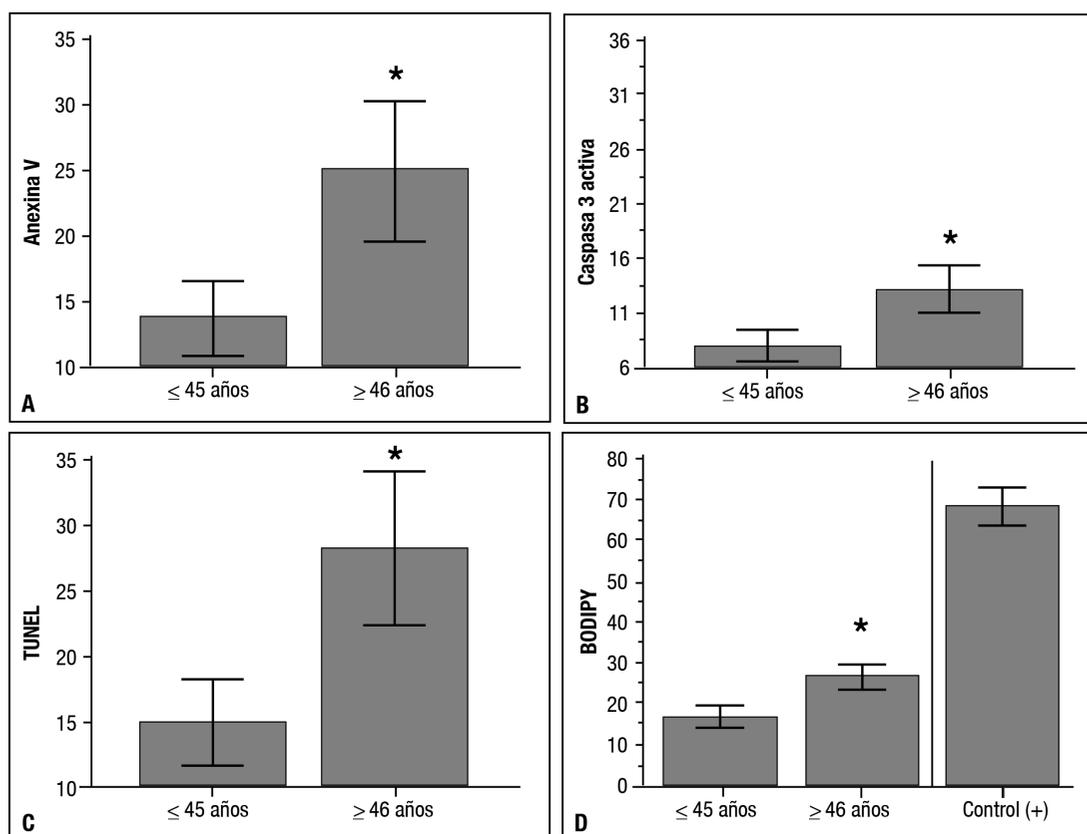
**Figura 4.** Niveles de correlación entre la EDAD vs Anexina V (A), Caspasa 3 activa (B), TUNEL (C) y BODIPY (D).



**Tabla 2.** Análisis comparativo de las características seminales, niveles de apoptosis y peroxidación lipídica entre pacientes con edades  $\leq 45$  años vs  $\geq 46$  años.

| N total = 60      | EDAD $\leq 45$ años (N=38)<br>X $\pm$ DS (IC 95%) | EDAD $\geq 46$ años (N=22)<br>X $\pm$ DS (IC 95%) | p (IC 95%)                  |
|-------------------|---|---|-----------------------------|
| Concentración     | 49.2 $\pm$ 19.4 (42.8 - 55.6)                     | 47.2 $\pm$ 27.3 (35.1 - 59.3)                     | 0.74 (4.2 - 10.1)           |
| Movilidad (a + b) | 37.1 $\pm$ 4.6 (35.5 - 38.6)                      | 30.2 $\pm$ 4.7 (28.1 - 32.3)                      | <b>0.001</b> (4.3 - 9.3)    |
| Morfología        | 7.5 $\pm$ 5.2 (5.8 - 9.2)                         | 5.4 $\pm$ 4.3 (3.4 - 7.3)                         | 0.10 (1.8 - 4.7)            |
| Anexina V         | <b>13.8 <math>\pm</math> 8.6 (10.9 - 16.7)</b>    | <b>25.0 <math>\pm</math> 12.1 (19.7 - 30.3)</b>   | <b>0.0001</b> (5.81 - 16.5) |
| Caspasa 3 activa  | <b>8.0 <math>\pm</math> 4.2 (6.6 - 9.4)</b>       | <b>13.2 <math>\pm</math> 4.8 (11.1 - 15.3)</b>    | <b>0.0001</b> (2.8 - 19.5)  |
| TUNEL             | <b>14.8 <math>\pm</math> 10.2 (11.4 - 18.1)</b>   | <b>28.1 <math>\pm</math> 13.4 (22.2 - 34.1)</b>   | <b>0.0001</b> (7.2 - 19.5)  |
| BODIPY            | <b>16.7 <math>\pm</math> 8.5 (13.9 - 19.4)</b>    | <b>26.5 <math>\pm</math> 7.3 (23.3 - 29.8)</b>    | <b>0.0001</b> (5.5 - 14.2)  |

**Figura 5.** Comparación de los niveles de (A) Anexina V, (B) Caspasa 3 activa, (C) TUNEL y (D) BODIPY, entre el grupo de pacientes con edad < de 45 años vs > 46 años (\* $p < 0.05$ ).



### Discusión

Se ha demostrado que los hombres con edad avanzada parecen producir espermatozoides con algún tipo de daño, por ejemplo, apoptosis, trastornos en la compactación de la cromatina, mutaciones genéticas y/o aneuploidías.<sup>6-7,35</sup> Algunos autores han reportado que el incremento de la fragmentación del ADN (TUNEL) puede estar vinculado a pacientes con edad avanzada. Sin embargo, sólo algunos de estos estudios encontraron alguna evidencia de un umbral en relación a la edad y el incremento significativo del daño del ADN.<sup>12,16,22</sup>

Nuestro grupo de trabajo ha venido realizando estudios de investigación a nivel de la apoptosis espermática y la fragmentación del ADN en un gran número de pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad

(TRA). En reportes publicados anteriormente, destacamos que los pacientes con trastornos en la morfología espermática y edad avanzada evidencian mayores niveles de fragmentación del ADN y apoptosis.<sup>36-37</sup>

En el presente trabajo se evidenció de manera prospectiva que existe una correlación positiva entre la edad y la presencia de fragmentación del ADN ( $r = 0.36$ ) y apoptosis (EPS  $r = 0.43$ , C3A  $r = 0.40$ ), pero a diferencia de trabajos anteriores, se demostró una correlación positiva con el marcador de peroxidación lipídica en la membrana espermática (BODIPY) ( $r = 0.32$ ), logrando concluir que en este grupo de varones que no presentan ninguna patología testicular ni alteración del eje hipotálamo - hipófisis - gónada, sería la edad que por efecto oxidativo estaría promoviendo el daño del espermatozoide. En otras palabras, quiere decir que a medida que aumenta la edad, in-

crementa la posibilidad del daño oxidativo y por consiguiente podría afectar la fisiología testicular promoviendo la formación de espermatozoides dañados a raíz de las EROs.<sup>6-7</sup> Al respecto, se han publicado numerosos trabajos que han descrito el efecto negativo del daño oxidativo (EROs) en relación a la integridad del espermatozoide, específicamente a nivel del ADN y cómo este evento impactaría en la fertilidad del varón.<sup>9,23,31-33</sup>

Por otro lado, en relación al umbral de edad, los trabajos previamente citados mencionan que a partir de los 35-36 años se puede observar un incremento significativo del daño espermático (fragmentación del ADN), sin embargo, en base a nuestros trabajos anteriores y al presente, encontramos que a partir de los 46 años no sólo se incrementa de manera significativa los niveles de fragmentación del ADN, apoptosis y peroxidación lipídica, sino que también alcanzan niveles que están por encima de los valores normales aceptados (TUNEL  $\leq$  20%), siendo en nuestra muestra un  $28.1 \pm 13.4\%$  (IC95% 22.2 - 34.1).

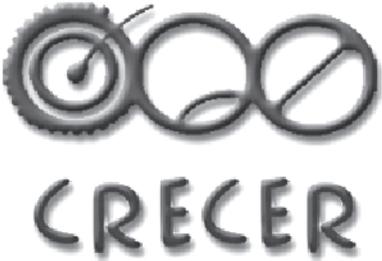
En la población estudiada al momento de comparar los varones según su edad ( $\geq$  46 años vs  $\leq$  45 años) no se evidenciaron diferencias significativas en relación a la morfología y la concentración, a pesar de que se observa una disminución en el promedio en los varones mayores a 46 años. Por otro lado, la movilidad progresiva (a+b) sí manifestó una significativa disminución en los varones mayores a 46 años. Al respecto, se sabe que el *stress* oxidativo producido por EROs tiene un impacto a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide promoviendo una disminución de la movilidad.<sup>38</sup> El presente trabajo muestra un importante hallazgo en relación al posible origen del daño del espermatozoide humano (daño oxidativo-edad) en los casos donde no existe una aparente causa fisiopatológica.

Finalmente, este grupo de pacientes en particular podría beneficiarse con la ingesta de suplementación dietética de antioxidantes que les permita controlar el desbalance oxidativo, para lo cual nuestro grupo de investigación ha iniciado un trabajo exploratorio relacionado a ese tema. Creemos que el diagnóstico eficaz de las patologías subyacentes (fragmentación del ADN, apoptosis, y *stress* oxidativo) es importante para el correcto y adecuado manejo de nuestros pacientes.

## Referencias

1. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, y col. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003;49:49-55.
2. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, y col. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378-383.
3. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1289-1295.
4. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;322:33-41.
5. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, y col. 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* 2008;89:1191-1199.
6. Aitken RJ, De Iulius GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009;32:46-56.
7. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027-1036.
8. Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, y col. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* 2005;28:171-179.
9. Aitken RJ, Wingate JK, De Iulius GN, y col. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4154-4163.
10. Aitken RJ, De Iulius GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007;14:727-733.
11. Banks S, King SA, Irvine DS, y col. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;129:505-514.
12. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;30:5-36.
13. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* 2007;28(2):241-249.
14. Smith R, Kaune H, Parodi D, y col. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil* 2007;135(3):279-286.
15. Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, y col. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod* 2010;25(8):1877-1883.
16. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, y col. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007;15(5):514-519.
17. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, y col. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009;91(3):831-837.
18. Moskovtsev SI, Willis J, White J, y col. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789-793.
19. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, y col. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66(4):1061-1067.

20. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, y col. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4):428-432.
21. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, y col. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7(4):469-476.
22. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003;80(6):1420-1430.
23. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, y col. Relationship between ROS 3 production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19(1):129-138.
24. Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*; 19(6):770-777.
25. Glander HJ, Schaller J. Binding of Annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999;5(2):109-115.
26. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, y col. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online* 2008;16(5):657-663.
27. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, y col. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24(2):246-252.
28. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, y col. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004; 81(1):802-809.
29. Shen HM, Dai J, Chia SE, y col. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002;17(5):1266-1273.
30. Aitken RJ y Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011;13:36-42.
31. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009;(4):357-367.
32. Saleh RA y Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23:737-752.
33. Aitken RJ, y col. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003;7(1):65-70.
34. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
35. Angelopoulou R, y col. ROS in the aging male: model diseases with ROS- related pathophysiology. *Reprod Toxicol* 2009;28(2):167-171.
36. Alvarez Sedó C, Uriondo Heydy, Alvarez G y col. Niveles de fragmentación del ADN espermático y marcadores de apoptosis en pacientes con teratozoospermia severa. *Reproducción* 2009;24:17.
37. Rawe VY, Alvarez Sedó C, Uriondo H, y col. Influencia de la patología espermática en reproducción asistida. *Reproducción* 2009;24(4):189-198.
38. Wang J, Wang J, Zhang J, y col. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl* 2009;11:484-491.



**Centro Especializado en Reproducción  
Mar del Plata**

|   |   |
|---|---|
| <p><b><u>Ginecología</u></b><br/> <b>Edgardo Andreatta</b><br/> <b>Miguel Correa</b><br/> <b>Claudio Distilo</b><br/> <b>Alfredo Carlos Elena</b><br/> <b>Guillermo Landi</b></p> | <p><b><u>Laboratorio de Embriología</u></b><br/> <b>Alicia I. Pené</b></p> <p><b><u>Andrología</u></b><br/> <b>Gustavo Frattini</b></p> <p><b><u>Laboratorio de Análisis Clínicos</u></b><br/> <b>Daniel Samaruga</b></p> |
|---|---|

**San Luis 2176 3º piso - (7600) Mar del Plata - Tel/Fax: 54-0223-493-8128 Tel. 491-7117**  
**mail: [info@crecerreproduccion.com.ar](mailto:info@crecerreproduccion.com.ar) - [www.crecerreproduccion.com.ar](http://www.crecerreproduccion.com.ar)**