

Fragmentación del ADN espermático: mecanismos de origen, repercusión en los resultados reproductivos y análisis*

Denny Sakkas, Juan G Álvarez

Actualmente, la fragmentación del ADN en el espermatozoide se ha convertido en un punto focal para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad. Conocer los mecanismos que inducen el daño puede ayudarnos a lograr mejores tratamientos y a analizar las posibilidades de embarazo.

Hoy día, además de existir varias pruebas diagnósticas, también se han desarrollado y aplicado algunas técnicas para seleccionar espermatozoides, las cuales deben ser del conocimiento general.

RESUMEN

Objetivo: revisar los mecanismos responsables de la fragmentación del ADN en los espermatozoides humanos, incluidos los que ocurren durante la espermatogénesis y el transporte a través del aparato reproductivo. Los mecanismos examinados incluyen: apoptosis en el epitelio de los túbulos seminíferos, defectos en la remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis, daño al ADN inducido por radicales de oxígeno durante la migración de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos hacia el epidídimo, activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas, daño inducido por quimio y radioterapia y el efecto de los tóxicos ambientales. También se discuten las diferentes pruebas utilizadas actualmente para el análisis de fragmentación de ADN espermático y los factores que determinan el valor predictivo de la prueba de fragmentación de ADN espermático y sus implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad. Finalmente, también se escudriña cómo las roturas de las cadenas de ADN en el genoma embrionario o las modificaciones de nucleótidos del ADN heredados del genoma paterno podrían afectar al embrión y la descendencia. En particular se discute cómo los espermatozoides anormales pueden ser tratados por el ovocito y cómo las anomalías en el ADN espermático –que no hayan sido reparadas satisfactoriamente por el ovocito después de la fertilización– pueden interferir con el desarrollo embrionario y fetal normal.

Conclusiones: el ADN espermático puede modificarse a través de varios mecanismos. La integridad del genoma paterno es, por tanto, de suma importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo viable en la concepción natural y en un procedimiento asistido de reproducción. La necesidad de diagnosticar los espermatozoides a nivel nuclear es un área que requiere mayor conocimiento para mejorar el tratamiento de la pareja infértil.

Palabras clave: fragmentación de ADN, fertilización *in vitro*, radicales de oxígeno, estrés oxidativo, caspasas, endonucleasas, quimioterapia, radiación ionizante.

ABSTRACT

Objective: To review the mechanisms responsible for DNA fragmentation in human sperm, including those occurring during spermatogenesis and transport through the reproductive tract. The mechanisms examined include: apoptosis in the seminiferous tubule epithelium, defects in chromatin remodeling during the process of spermiogenesis, oxygen radical-induced DNA damage during sperm migration from the seminiferous tubules to the epididymis, the activation of sperm caspases and endonucleases, damage induced by chemotherapy and radiotherapy, and the effect of environmental toxicants. The different tests currently used for sperm DNA fragmentation analysis and the factors that determine the predictive value of sperm DNA fragmentation testing and their implications in the diagnosis and treatment of infertility are also discussed. Finally, we also scrutinize how the presence in the embryonic genome of DNA strand breaks or modifications of DNA nucleotides inherited from the paternal genome could impact the embryo and offspring. In particular we discuss how abnormal sperm could be dealt with by the oocyte and how sperm DNA abnormalities, which have not been satisfactorily repaired by the oocyte after fertilization, may interfere with normal embryo and fetal development.

Conclusion(s): Sperm DNA can be modified through various mechanisms. The integrity of the paternal genome is therefore of paramount importance in the initiation and maintenance of a viable pregnancy both in a natural conception and in assisted reproduction. The need to diagnose sperm at a nuclear level is an area that needs further understanding so that we can improve treatment of the infertile couple.

Key words: DNA fragmentation, *in vitro* fertilization, oxygen radicals, oxidative stress, caspases, endonucleases, chemotherapy, ionizing radiation.

Los espermatozoides con daño en el ADN son capaces de fertilizar de manera eficiente un óvulo.¹⁻³ Sin embargo, la pregunta sigue siendo cuáles son los efectos más probables en el desarrollo embrionario y fetal normal cuando el genoma paterno introduce nucleótidos o ADN con daños que no han sido reparados por el ovocito después de la fertilización.⁴⁻⁷ Una cantidad relativamente alta de mujeres no logra tener un embarazo a pesar de la ausencia aparente de un factor masculino o femenino de infertilidad. Es probable que muchas de estas parejas tengan un factor masculino de infertilidad de tipo genómico, el cual puede incluir daño en el ADN espermático, alteraciones meióticas o aneuploidía espermática. Sin embargo, la capacidad del ovocito y del embrión humano de reparar el daño al ADN es poco conocida y nuestro conocimiento actualmente se limita a un cierto número de estudios de expresión genética que muestran que el embrión y el ovocito están equipados con mecanismos para hacer frente a algunas anomalías en el ADN paterno.^{8,9} Primero, la capacidad del ovocito de iniciar la reparación depende, en gran medida, de la calidad citoplásmica y genómica del ovocito, la cual es afectada de manera importante por el aumento de la edad. Segundo, la calidad del ADN espermático presente en un espermatozoide está cada vez más ligada a la edad paterna¹⁰ y esto puede agravar aún más la disminución de la tasa de embarazo observada en mujeres de edad avanzada.¹¹

Se ha postulado que, en embriones generados *in vivo* e *in vitro*, la presencia por encima de un umbral crítico de daño sin reparar en el ADN explica el bloqueo en el desarrollo embrionario observado después de la implantación en embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa durante y después de la implantación y se ha caracterizado como efecto paterno tardío.^{12,13} También hay indicios de altos niveles de daño en el ADN en una muestra de esperma con incapacidad para obtener blastocistos¹⁴ y se cree que, entre la activación posembriónica del genoma

y el estadio de blastocisto, se produce cierta pérdida de embriones de preimplantación.^{15,16}

El daño en el ADN encontrado en el embrión no siempre se relaciona con el daño en el ADN en el espermatozoide que fertilizó el ovocito. Un nivel significativo de anomalías del ADN surge del ovocito. Si se toman como ejemplo estudios de aneuploidía, los problemas en el ovocito siguen siendo el factor que más contribuye.^{17,18} Las técnicas analíticas futuras pueden concentrarse en el uso combinado de sondas cromosómicas y pruebas de fragmentación de ADN en biopsias de embriones, lo que permitiría un análisis más robusto, que incluya no sólo el diagnóstico de enfermedades monogénicas y aneuploidía, sino también el grado de daño del ADN en el embrión, lo que permitiría seleccionar embriones de la más alta calidad genómica. Otra estrategia potencial para examinar si el daño al ADN ha sido o no reparado por el ovocito o el embrión sería mediante el análisis de fragmentación de ADN en células trofoblásticas obtenidas mediante biopsia del blastocisto.

MECANISMOS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

¿Cómo ocurre el daño al ADN espermático? El daño al ADN en los espermatozoides puede afectar al ADN mitocondrial y al ADN nuclear y puede ser inducido mediante seis mecanismos principales. Éstos pueden ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas e incluyen (Figura 1): 1) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; 2) roturas en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática durante el proceso de espermiogénesis; 3) fragmentación posttesticular del ADN inducida principalmente por radicales de oxígeno (incluidos el radical hidroxil y óxido nítrico) durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo; 4) fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas, y 6) daño al ADN inducido por tóxicos ambientales.

De estos seis mecanismos, el daño posttesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo puede tener una participación importante en el origen de la fragmentación del ADN espermático. Esto está apoyado por informes previos que demuestran

* Traducido de: Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027-1036.

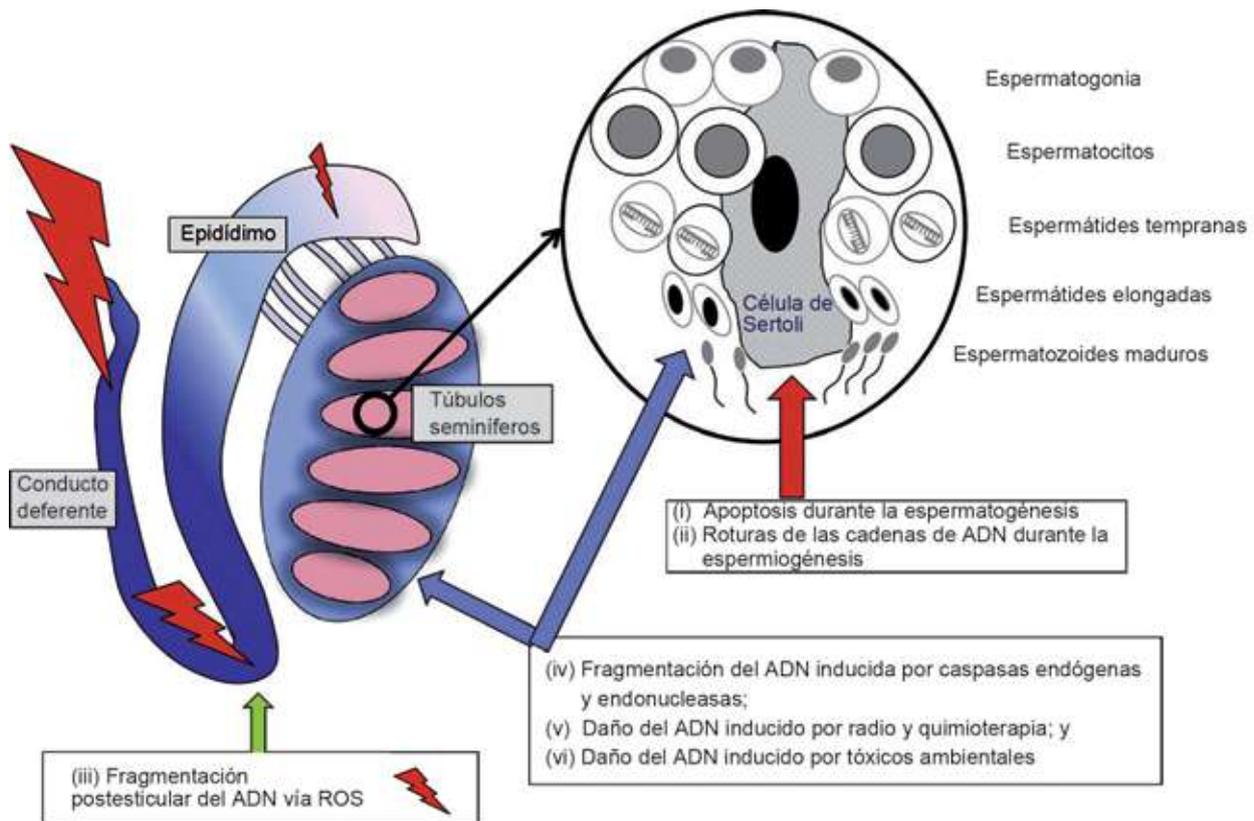


Figura 1. Mecanismos principales de inducción de daño al ADN en espermatozoides durante la producción o el transporte de las células espermáticas: (i) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; (ii) roturas en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática durante el proceso de espermiogénesis; (iii) fragmentación posttesticular del ADN inducida principalmente por radicales de oxígeno durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo (el aumento del daño en el ADN está indicado por el tamaño de los destellos rojos y el oscurecimiento gradual en el tracto); (iv) fragmentación del ADN inducida por caspasas endógenas y endonucleasas; (v) daño en el ADN inducido por radio y quimioterapia; y (vi) daño en el ADN inducido por tóxicos ambientales.
Sakkas. Sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2010.

que la fragmentación del ADN es mayor en el espermatozoides epididimal caudal y eyaculado^{19,20} en comparación con los espermatozoides testiculares. Informes recientes confirmaron esta hipótesis.²¹ Sin embargo, la pregunta sigue siendo si las fallas durante la espermatogénesis han hecho al espermatozoides más susceptible al daño posttesticular.

Inducción de la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis

Durante el proceso de espermatogénesis el mecanismo de selección de células germinales gobernado por la célula de Sertoli es responsable de la inducción de la apoptosis en 50 a 60% de todas las células germinales

que entran en la meiosis I. Estas células están asignadas con marcadores apoptóticos de tipo *Fas* y deben ser fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli con la que estas células germinales están asociadas.²²⁻²⁴ Sin embargo, este mecanismo no siempre puede operar eficazmente y un porcentaje variable de estas células germinales defectuosas entra en el proceso de remodelación espermática durante la espermiogénesis y posteriormente aparecen en la eyaculación. En relación con la falla de este mecanismo de selección, los resultados de un estudio reciente de Burrello y coautores²⁵ sugieren que existe una disociación entre la calidad genómica en la célula germinal y la remodelación espermática que ocurre durante el

proceso de espermiogénesis. Es decir, una célula germinal puede tener su núcleo “desorganizado” por la apoptosis o ser aneuploide y, aún así, los espermatozoides tendrán una morfología normal. Por tanto, cuando un espermatozoide con morfología normal es microinyectado no necesariamente significa que la calidad genómica también es normal. De manera interesante, recientemente se propuso que el mecanismo de apoptosis en la espermiogénesis puede estar menos relacionado con el de muerte celular, pero ser más responsable del proceso de “desprendimiento” del citoplasma en los estadios finales de la maduración espermática.²⁶

Se ha demostrado que en hombres con oligospermia, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal sea aneuploide es mucho mayor que cuando el hombre es normospermico.²⁵ Probablemente esto está relacionado con la detención parcial de la maduración asociada con alteraciones meióticas. El hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides en la eyaculación exprese marcadores apoptóticos, por ejemplo, Fas, fosfatidilserina, Bcl-X_L, p53,²⁷⁻³⁰ indica que este fenómeno podría ser utilizado para seleccionar espermatozoides no apoptóticos a partir de muestras de semen.³¹ Un método introducido recientemente con este propósito es el uso de microesferas anexina-V-conjugadas (ANMB Microbead Kit; Miltenyl Biotec, Alemania). El principio en el que se basan estas columnas es que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilserina en la hoja externa de la membrana espermática y se fijan a la anexina-V. Cuando se aplica un campo magnético a las columnas, los espermatozoides unidos a anexina-V se conjugan con las microesferas magnéticas y son retenidos en la columna, mientras que los espermatozoides no apoptóticos pasan a través de la columna.³²

Roturas de ADN durante el proceso de espermiogénesis

Las alteraciones en la reestructuración de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis puede resultar en la fragmentación del ADN. McPherson y Longo³³⁻³⁵ postularon que la existencia de cortes de ADN en los espermatozoides eyaculados puede ser un indicador de una maduración incompleta durante la espermiogénesis. Postularon que el empaquetado de cromatina puede requerir la actividad de nucleasas endógenas para crear y

ligar cortes que facilitan la protaminación. Se cree que estos cortes proporcionan alivio a la tensión torsional para ayudar al arreglo de la cromatina durante el reemplazo de las histonas por protaminas y se cree que ocurre el mismo procedimiento en humanos.³⁶ Las alteraciones en el control de este proceso pueden resultar en anomalías en el empaquetamiento de la cromatina o cortes no reparados de ADN. Estas roturas de ADN ocurrirían antes de la espermiación y es probable que los hagan más susceptibles al ataque postesticular.

Fragmentación postesticular de ADN espermático

Estudios recientes muestran que los espermatozoides inmaduros, los cuales producen altos niveles de ROS, pueden inducir daño en el ADN de espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos hacia la cola del epidídimo.²⁰ Aunque la vida media de ROS es del orden de nanosegundos a microsegundos, debido a que los espermatozoides están altamente comprimidos en el epidídimo, esto facilitaría el daño al ADN inducido por ROS. El ROS puede dañar el ADN espermático directa o indirectamente a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. Esto es consistente con el hecho de que la cocentrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen altas concentraciones de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la inducción de fragmentación de ADN espermático en espermatozoides maduros, debido a que bajo estas condiciones, los espermatozoides maduros e inmaduros están en contacto estrecho.³⁷ Esto también es consistente con el hecho de que la exposición *in vitro* de los espermatozoides maduros a ROS resulta en daño significativo al ADN.^{3,38} Asimismo, las células epiteliales del epidídimo también podrían desempeñar un papel activo en el daño al ADN inducido por ROS, 1) a través de ROS, como el radical hidroxil o el óxido nítrico³⁹ o 2) a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas mediante factores fisicoquímicos, como temperatura alta⁴⁰ y factores ambientales.⁴¹ En el primer caso, este daño teóricamente podría prevenirse con el consumo de antioxidantes, mientras que en el segundo caso este tratamiento no sería efectivo.

Esto está apoyado por el estudio de Greco y colaboradores¹⁹ en el que el consumo de antioxidantes resultó en reducción significativa de los niveles de fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, debe tenerse cuidado cuando se utiliza terapia antioxidante. Se informó que algunos antioxidantes, como la vitamina C, pueden aumentar la compactación de cromatina reduciendo el entrecruzamiento disulfuro en las protaminas espermáticas.⁴²

Lo más probable es que los espermatozoides con niveles mayores de daño al ADN serían los que adquieren niveles menores de entrecruzamiento disulfuro en su cromatina espermática durante el proceso de maduración espermática en el epidídimo. Una característica interesante que ha surgido de estudios recientes es que, en general, el grado de fragmentación del ADN espermático en espermatozoides eyaculados es más alto que en los espermatozoides testiculares^{19,43} y en los espermatozoides del cuerpo y la cola del epidídimo—que son precisamente donde se lleva a cabo el proceso de entrecruzamiento disulfuro— y que la inducción de la fragmentación del ADN espermático en el epidídimo podría estar relacionada con su calidad genómica. Es decir, además del mecanismo de selección ejercido por la célula de Sertoli durante el proceso de espermatogénesis, habría otro mecanismo de selección en el epidídimo dirigido a eliminar los espermatozoides defectuosos genómicamente.²¹

El daño potencial que los espermatozoides pueden experimentar durante el paso a través del epidídimo podría limitarse eliminándolos antes de ese paso. Esto tiene mayor importancia clínica en los casos de niveles altos de fragmentación del ADN en el semen y de fracaso repetido de la FIV, donde podría recurrirse al uso de espermatozoides testiculares obtenidos por la extracción de esperma testicular (TESA o TESE, por sus siglas en inglés); preferentemente TESA, ya que es menos invasivo y tendría mayor aceptación por el ginecólogo y la paciente. Esto está apoyado por los resultados informados por Greco y colaboradores,¹⁹ en los que la microinyección de espermatozoides testiculares en pacientes que previamente mostraron falla con su esperma eyaculado, con niveles de fragmentación de ADN en semen >15%, medido por etiquetado terminal Tdt-dUTP-mediado (TUNEL, por sus siglas en inglés),

resultó en una tasa de embarazo clínica de 44.4% comparada con una tasa de embarazo clínica de 0% con espermatozoides eyaculados.

La fragmentación de ADN espermático inducida por el radical hidroxil y la radiación ionizante causa la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en un primer estadio y posteriormente, fragmentación monocatenaria del ADN.⁴⁴ Además, la formación del radical hidroxil puede resultar en la inducción de daño bicatenario al ADN espermático mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. Aunque el daño del primer tipo puede ser reparado por el ovocito o el embrión, la fertilización de un ovocito por un espermatozoide con fragmentación bicatenaria extensa del ADN es prácticamente no reparable e incompatible con el desarrollo embrionario y fetal normal.

Activación de caspasas y endonucleasas

La activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por radicales de oxígeno y factores fisicoquímicos también puede inducir fragmentación del ADN. Estudios previos indican que la exposición del esperma de ratón a una temperatura de 40°C aumenta significativamente la fragmentación del ADN espermático.⁴⁵ Recientemente, Banks y colaboradores⁴⁰ demostraron la inducción de fragmentación del ADN espermático después de la exposición *in vivo* de testículos de ratón a una temperatura de 42°C. Debido a que el aumento en la fragmentación del ADN espermático observada en estos ratones ocurrió dentro de una hora después de la exposición al calor, los investigadores concluyeron que el daño observado debe haber ocurrido en el epidídimo y podría haber sido causado por ROS o por la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. Si se considera que los núcleos del esperma de ratón están empaquetados más homogéneamente, la probabilidad de que el esperma humano sea susceptible al calor es mucho mayor, debido a las menores concentraciones de protaminas en los núcleos y a la mayor heterogeneidad del empaquetado nuclear.⁴⁶

Fragmentación del ADN inducida por quimioterapia y radioterapia

Se reportó que la exposición a quimioterapia y radioterapia puede resultar en la inducción de fragmentación del

ADN espermático. Se cree que los tratamientos contra el cáncer afectan negativamente la fertilidad masculina y que la reducción en la producción de espermatozoides surge de los efectos citotóxicos de la quimio o radioterapia en el epitelio espermatogénico.⁴⁷ Aunque en pacientes con cáncer el examen del ADN espermático ha sido limitado, un estudio reciente de O'Flaherty y colaboradores⁴⁸ encontró que la integridad y compactación del ADN espermático estaban afectadas en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin antes de la quimioterapia. Al examinar las diferentes técnicas de evaluación del daño al ADN los investigadores concluyeron que aunque el ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA, por sus siglas en inglés), el TUNEL y el ensayo cometa detectaron daño en el ADN, este último era óptimo para ser utilizado en pacientes con cáncer. Se cree que una combinación del ensayo cometa con pruebas que evalúan la compactación del ADN espermático, tal como ensayos mBBr y CMA3 basados en citometría de flujo, es una estrategia confiable para caracterizar la calidad de la cromatina espermática en pacientes con cáncer al momento del almacenamiento de esperma.

Daño al ADN inducido por tóxicos ambientales

Estudios previos proporcionaron evidencia de una asociación entre la exposición a niveles altos de contaminación del aire y aumento en el daño al ADN en espermatozoides humanos. En un estudio reciente, Rubes y colaboradores⁴¹ ampliaron estas observaciones y abordaron la hipótesis de que los hombres que son homocigotos nulos para la glutatión-S-transferasa M1 son menos capaces de detoxificar metabolitos reactivos de hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinógenos encontrados en la contaminación del aire. Por consiguiente, estos hombres son más susceptibles a los efectos de la contaminación del aire en la cromatina espermática. Con un diseño de estudio longitudinal en el cual los hombres proporcionaron muestras de semen durante periodos de contaminación de aire baja (basal) y episódicamente alta, los investigadores encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo nulo para glutatión-S-transferasa M1 y el aumento de la fragmentación del ADN espermático. Además, los hombres con genotipo nulo para glutatión-S-transferasa

M1 también mostraron niveles más altos de fragmentación del ADN espermático en respuesta a la exposición a contaminación intermitente del aire.⁴¹

PRUEBAS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Durante las pasadas dos décadas se introdujo una serie de pruebas para el análisis de la fragmentación del ADN espermático. Estas pruebas incluyen TUNEL,⁴⁹ cometa,⁵⁰ CMA3,⁵¹ traducción de cortes *in situ*,^{46,52} DBD-FISH (hibridación *in situ* de fluorescencia para detección de roturas de ADN),⁵³ prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD, por sus siglas en inglés)⁵⁴ y SCSA.⁵⁵⁻⁵⁸ Un aspecto importante en el análisis de la fragmentación del ADN espermático es la pregunta relacionada con el tipo de roturas producidas en las cadenas de ADN, por ejemplo, si las roturas son mono o bicatenarias y si requieren un paso inicial de desnaturalización para detectar roturas en el ADN, como el SCSA, SCD,⁵⁴ o el cometa, con un pH ácido o alcalino.⁵⁹ De hecho, cuando el daño al ADN se observa bajo condiciones ácidas o alcalinas –y no bajo condiciones de pH neutro– deberíamos estar hablando de sitios de ADN ácido-alcalino lábiles.¹⁰ Asimismo, las pruebas TUNEL,⁴⁹ de traducción de cortes *in situ* (ISNT, por sus siglas en inglés)⁴⁶ y el ensayo cometa a pH neutro⁶⁰ no requieren un paso inicial de desnaturalización y, por tanto, miden las roturas monocatenarias (ISNT, TUNEL y cometa) o bicatenarias (TUNEL y cometa) directamente. Debido a que el pH intracelular en el ovocito es de alrededor de 7.0,^{61,62} las roturas monocatenarias de ADN o los sitios ácido-alcalino lábiles no deben ser de consecuencias significativas en la formación del pronúcleo masculino, ya que a un pH neutro las cadenas de ADN no se disociarían y, por tanto, este tipo de daño sería más fácil de reparar que el daño bicatenario en el ADN.

Por tanto, como un primer examen, podríamos considerar dos tipos de pruebas: 1) pruebas que miden el daño al ADN directamente, como TUNEL, ISNT, o cometa a pH neutro, y 2) pruebas que miden el daño al ADN después de la desnaturalización, como SCSA, SCD y cometa a pH ácido o alcalino.⁵⁹ Un estudio reciente reportado por Borini y colaboradores¹³ mostró que los valores de fragmentación del

ADN espermático en alícuotas de los mismos espermatozoides utilizados para FIV, valorados mediante TUNEL, se correlacionaron significativamente con el resultado del embarazo. Esto tiene un marcado contraste con los resultados reportados por Bungum y colaboradores,⁶³ quienes no encontraron correlación entre los valores de fragmentación del ADN espermático en las muestras utilizadas para FIV, medidos por la prueba SCSA, y el resultado del embarazo. Es importante observar que aunque la prueba TUNEL se utiliza frecuentemente para la determinación de la apoptosis celular, la positividad del TUNEL no es sinónimo de apoptosis, ya que el daño al ADN inducido por el radical hidroxil o la radiación ionizante también causa fragmentación del ADN que puede ser detectada como un resultado positivo por la prueba TUNEL.⁶⁴ El concepto reportado en muchos artículos de evaluación del ADN espermático que establece que la prueba TUNEL se asocia con la apoptosis es una gran sobreestimación de la capacidad de esta prueba.

Hasta la fecha, la prueba estudiada más extensamente desde el punto de vista clínico es la prueba SCSA, desarrollada por Evenson y colaboradores.^{55,58,65-68} La prueba SCSA, según Evenson, mide la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización después de la exposición a un ácido débil. El ADN de espermatozoides con una estructura de cromatina normal no se desnaturaliza, mientras que si el ADN está algo dañado y contiene roturas en las cadenas de ADN, éste puede alcanzar diferentes grados de desnaturalización. Para determinar el grado de desnaturalización del ADN espermático, después del tratamiento con un ácido débil, las células espermáticas son teñidas con naranja de acridina. Debido a que el naranja de acridina es un fluorocromo metacromático, muestra fluorescencia verde cuando está intercalado entre ADN bicatenario intacto y muestra fluorescencia roja en ADN monocatenario. El grado de daño al ADN es medido por citometría de flujo y se expresa como índice de fragmentación del ADN o IFA. Estudios previos indican que un valor IFA > 27% se asocia con falla de embarazo en tecnología de reproducción asistida.^{57,69} Sin embargo, como se indicó, informes recientes desafían el valor predictivo de la prueba SCSA.^{2,70,71} Sin embargo, debe advertirse que la prueba SCSA se ha

sometido a mayor escrutinio que otras pruebas y que otros estudio clínicos pueden revelar limitaciones en otras pruebas, como las pruebas TUNEL y SCD/Halo.

VALOR PREDICTIVO DE LAS PRUEBAS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

El valor predictivo de las pruebas de fragmentación del ADN espermático depende de una serie de factores. Éstos incluyen:

1. *Tipo de daño al ADN: daño monocatenario versus bicatenario al ADN.* Como aproximación general, el daño monocatenario al ADN es de mejor pronóstico y más fácil de reparar que el daño bicatenario al ADN. Como se comentó, la fragmentación monocatenaria del ADN puede ser causada por cortes en el ADN no reparados durante el proceso de remodelación de la cromatina. También podría estar causada por daño inducido por radicales de oxígeno. El daño bicatenario al ADN habitualmente es causado por apoptosis, hidrólisis por caspasas y endonucleasas, y por daño inducido por radicales de oxígeno mediante la activación de caspasas y endonucleasas. La extensión del daño bicatenario al ADN inducido por radicales de oxígeno durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo puede estar determinada no sólo por los niveles de radicales de oxígeno producidos por espermatozoides inmaduros, células epiteliales de epidídimo o leucocitos activados, sino también por los niveles de enzimas antioxidantes presentes en la luz del epidídimo.³⁹
2. *Porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN.* A la fecha la mayor parte de los estudios han analizado este aspecto de la relación entre la fertilidad y el daño al ADN espermático. En general, los resultados apuntan a mayor utilidad de las pruebas de ADN espermático en relación con la concepción natural e inseminación intrauterina antes que los tratamientos de tecnología de reproducción asistida, como FVI normal e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, por sus siglas en inglés).⁷² Es importante tener en cuenta que la calidad del ADN espermático en los espermatozoides utilizados en la fertilización es el único factor im-

portante. En las técnicas, como FIV o ICSI, aunque un alto porcentaje de espermatozoides de la muestra puede tener ADN dañado, todavía puede seleccionarse un espermatozoide “sin daño al ADN”. Se requiere comprender mejor la extensión del daño al ADN en espermatozoides individuales y la forma en que diferentes técnicas de procesamiento espermático pueden eliminar espermatozoides con daño al ADN.

3. *Extensión del daño al ADN por espermatozoide.* Las principales cuestiones que no se han probado en humanos son: 1) ¿Cuál es el grado de daño al ADN en un espermatozoide individual? y 2) ¿A cuánto daño al ADN espermático puede hacer frente un ovocito? En estudios con ratones se demostró una correlación entre cantidades cada vez mayores de inductores de daño al ADN (calor y radiación) y el resultado reproductivo.⁷³⁻⁷⁵ Por ejemplo, los estudios de Ahmadi y Ng^{74,75} mostraron que se alcanzaban tasas de fertilización de alrededor de 60% cuando los espermatozoides fueron sometidos a 0, 5, 10, 50 y 100 GY. Sin embargo, el desarrollo del blastocisto disminuyó de 49.8% en el grupo control a 2.3% con espermatozoides expuestos a dosis de 5-100 GY. De los blastocistos transferidos en el grupo control, 33.9% se convirtieron en fetos vivos, mientras que estas tasas fueron de 20 y 0% cuando los espermatozoides se expusieron a dosis de 5 y 10 GY. Los investigadores concluyeron que el desarrollo embrionario y fetal está mucho más relacionado con el grado de daño al ADN y que el ovocito tiene la capacidad de reparar el daño al ADN espermático cuando está dañado en menos de 8%.
4. *Si existe daño combinado de nucleótidos y fragmentación del ADN.* El daño posttesticular al ADN espermático inducido por el radical hidroxil o después de la exposición a radiación ionizante está asociado con el daño a nucleótidos del tipo 8-OHdG. Como se indicó previamente, con este tipo de daño, en un primer estadio el daño producido es de tipo 8-OHdG, seguido de la fragmentación bicatenaria del ADN que puede estar mediada por caspasas y endonucleasas. Las implicaciones del daño combinado de nucleótidos y la fragmentación de cadenas de ADN es que, además de su valor diagnóstico (el daño inducido por radicales de oxígeno es sensible al tratamiento antioxidante), puede tener un peor pronóstico, ya que la mayor parte de las células espermáticas será afectada por uno u otro tipo de daño.
5. *Si el daño al ADN afecta intrones o exones.* Más de 90% del ADN está compuesto de intrones. Por consiguiente, la probabilidad de que el daño al ADN afecte los exones, que son las secuencias que codifican proteínas, es relativamente baja. Por tanto, la pregunta es si la mayor parte del daño al ADN es de naturaleza arquitectónica y si esto puede tener implicaciones a largo plazo.
6. *Capacidad del ovocito de reparar el daño al ADN espermático en el espermatozoide que lleva a cabo la fertilización.* De los diferentes factores que tienen repercusión en el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN espermático, la capacidad de reparación del ADN que tiene el ovocito posiblemente es el más importante. El ovocito de ratón tiene la capacidad de reparar el daño al ADN espermático,⁷⁶ aunque esta capacidad es limitada y puede variar de ovocito en ovocito e, incluso, entre diferentes cohortes de ovocitos del mismo paciente o de diferentes pacientes. También puede depender de la edad de la mujer. Asimismo, la capacidad del ovocito de reparar el daño al ADN espermático en el espermatozoide encargado de la fertilización también depende del tipo de daño al ADN. Como se indicó, el daño al ADN espermático puede clasificarse como mono y bicatenario. En general, el daño monocatenario al ADN es más fácil de reparar que el daño bicatenario, aunque existe evidencia de que las polimerasas también pueden reparar el daño bicatenario al ADN.⁷⁷ Por consiguiente, aun si el espermatozoide encargado de la fertilización tuviera daño al ADN en su genoma, el ovocito podría reparar este daño y, por tanto, sería irrelevante para el desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, no es posible determinar si el ovocito sería capaz de reparar este daño. Además, las pruebas de fragmentación de ADN disponibles actualmente no pueden proporcionar información sobre la “reparabilidad” del daño al ADN. Por consiguiente, hay dos niveles de incertidumbre que no pueden resolverse con las pruebas diagnósticas actualmente disponibles. Sin

embargo, si postulamos que el daño irreparable al ADN espermático no es compatible con el desarrollo embrionario y fetal normal, en las parejas en las que el hombre tiene fragmentación del ADN espermático de tipo irreparable, no debe lograrse un embarazo y la pareja acudiría a clínicas de infertilidad con infertilidad de largo tiempo de evolución o falla repetida del embarazo en tecnología de reproducción asistida sin causa aparente. Si la fragmentación del ADN espermático es el factor limitante, las estrategias dirigidas a disminuir los niveles de fragmentación de ADN deben mejorar el resultado de embarazo en parejas sin causa aparente de su problema de infertilidad.

Como se expuso, los reportes demostraron que el daño al ADN espermático es significativamente menor en los túbulos seminíferos en comparación con la cola del epidídimo^{21,78} o el esperma eyaculado,¹⁹ y que el uso de espermatozoides testiculares en parejas con falla repetida para lograr un embarazo en tecnología de reproducción asistida y alta fragmentación del ADN espermático en semen resultó en aumento significativo de las tasas de embarazo en estas parejas.^{19,79} Además, un informe reciente muestra que las tasas de embarazo en los primeros ciclos de TESA-ICSI son relativamente altas (Cuadro 1). Estos resultados son consistentes con el concepto de que en parejas con infertilidad de larga evolución o falla repetida para lograr un embarazo con tecnología de reproducción asistida sin causa aparente, la fragmentación del ADN espermático podría ser el factor limitante responsable de su falla de embarazo, y que el uso de espermatozoides testiculares con niveles muy bajos de fragmentación del ADN elimina del ovocito la carga de reparación de ADN del espermatozoide encargado de la fertilización. Sin embargo, el uso de esperma testicular puede no siempre solucionar el problema, ya que el daño al ADN espermático también puede ocurrir en el epitelio de los túbulos seminíferos mediante apoptosis o deberse a defectos en la remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis. No obstante, en la mayoría de los casos, el daño al ADN espermático ocurre o aumenta en el epidídimo y, por consiguiente, los niveles de fragmentación de ADN en los espermatozoides testiculares deben ser menores.¹⁹

Cuadro 1. Resultados de TESA-ICSI en parejas con falla repetida a FIV y niveles altos de fragmentación del ADN espermático en semen

<i>Características</i>	<i>Valores</i>
Parámetros de semen y casos	
Casos evaluados	68
Casos de TESA-ICSI realizada	31
IFA promedio en semen	39.4%
Concentración espermática promedio (millones/mL)	44.7
Edad masculina promedio	41.9
Resultados	
Tasa de fertilización	58% (20-100%)
Número de embriones transferidos	2.3
Tasa de embarazo clínico	40%
Tasa de embarazo en el primer ciclo TESA-ICSI	93%

IFA: índice de fragmentación del ADN; TESA-ICSI: extracción de espermatozoides testiculares-inyección espermática intracitoplasmática.

Sakkas. Sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2010.

Un asunto que debe considerarse cuando se utilizan espermatozoides testiculares es la posibilidad de microinyectar espermatozoides testiculares con una probabilidad alta de tener anomalías cromosómicas. Es bien sabido que la tasa de aneuploidía en los espermatozoides testiculares es mayor que en el esperma eyaculado. Esto podría deberse a la eliminación selectiva de los espermatozoides aneuploides durante el paso a través del epidídimo.⁸⁰ Sin embargo, la conclusión de que la tasa de aneuploidía en el esperma testicular es significativamente mayor que en el esperma eyaculado proviene, en la mayor parte, de estudios que utilizaron espermatozoides de hombres gravemente oligospermicos o azospermicos. En contraste, en la mayoría de los pacientes con altos niveles de fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados en los cuales está indicado el uso de espermatozoides testiculares, la concentración de espermatozoides en el semen es normal y, por consiguiente, no nos estamos enfrentando con hombres gravemente oligospermicos o azospermicos donde el riesgo de aneuploidía espermática es mayor. En un informe reciente se demostró que las tasas de embarazo, utilizando espermatozoides testiculares en parejas con niveles altos de fragmentación de ADN, fueron significativamente mayores que al utilizar espermatozoides

eyaculados y que las tasas de aborto espontáneo fueron significativamente menores (Cuadro 2). Si el uso de espermatozoides testiculares en parejas con niveles altos de fragmentación de ADN espermático fuera un riesgo significativo, las tasas de embarazo deberían ser menores y las tasas de aborto espontáneo, mayores. Sin embargo, los resultados indican lo contrario y que ésta es una técnica relativamente segura cuando se aplica a estas parejas.¹³

7. *Tipo de prueba de fragmentación de ADN utilizado.*

Como se indicó, deben recomendarse de preferencia las pruebas que miden directamente el daño al ADN sin un paso previo de desnaturalización, como TUNEL; especialmente cuando se combinan con citometría de flujo. Esto aumenta la capacidad de reproducir el resultado de la prueba, así como su confiabilidad.

8. *Procesamiento de los espermatozoides en tecnología de reproducción asistida.*

El daño al ADN puede ocurrir durante el procesamiento de los espermatozoides. Estudios previos demostraron que la incubación de semen a temperatura ambiente⁸¹ o a 37°C⁸² después de su aislamiento mediante centrifugación por gradiente de densidad puede resultar en aumento de los niveles de fragmentación de ADN espermático. También, la criopreservación de los espermatozoides puede causar aumento en la fragmentación del ADN.⁸³ Además, la centrifugación de semen bruto puede aumentar la fragmentación de ADN. Por tanto, el procesamiento de los espermatozoides en tecnología de reproducción asistida debe regirse por el principio *primum non nocere*. Es decir, 1) debe evitarse la

incubación innecesaria de semen y suspensiones de espermatozoides; 2) la centrifugación por gradiente de densidad parece ser la mejor manera de procesamiento de semen,⁸⁴⁻⁸⁹ y 3) deben utilizarse métodos de criopreservación que minimicen la fragmentación de ADN espermático. Un valor IFA puede ser normal en el semen licuado y anormal en los espermatozoides utilizados para la tecnología de reproducción asistida. Esto dará resultados falsos-negativos y alterará el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN espermático. Una manera de minimizar el efecto de la incubación del semen en la fragmentación del ADN sería mediante la disminución del tiempo entre el procesamiento del semen y la inseminación. Además, en el caso de la criopreservación de espermatozoides, debe recomendarse el uso de medios complementados con antioxidantes. Un aspecto importante que debe tomarse en cuenta acerca de la relación entre el procesamiento de espermatozoides y la fragmentación de ADN es que, en caso de que una cantidad crítica de espermatozoides en la muestra de semen tenga cromatina intacta, el procesamiento de espermatozoides puede resultar en el enriquecimiento de estos espermatozoides y, por tanto, aumentar las oportunidades de lograr un embarazo viable.

9. *Número de ovocitos.* En parejas en quienes el nivel de fragmentación del ADN es relativamente alto, la probabilidad de que se produzcan embriones normales o embarazos viables dependerá, al menos parcialmente, de la cantidad de ovocitos obtenidos en metafase II y de su capacidad de reparar el daño al ADN en los espermatozoides fertilizantes. Por ejemplo, si se obtienen

Cuadro 2. Resultado de embarazo en pacientes con niveles altos de fragmentación de ADN espermático al ser tratados con espermatozoides eyaculados en comparación con espermatozoides testiculares

	Tasa de embarazo bioquímico	Tasa de embarazo clínico	Tasa de implantación	Tasa de aborto espontáneo
Espermatozoides eyaculados (n = 42)	6.9%	13.79%	6.56%	75%
Espermatozoides testiculares (n = 30)	2.5%	40%	28.09%	6.25%
Valor p	NS	.035	.0021	.017

Nota: todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron un valor del índice de fragmentación de ADN >20% mediante TUNEL; análisis estadístico mediante prueba de ji al cuadrado. Sakkas. Sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2010.

10 ovocitos en metafase II, la probabilidad de tener un embarazo será mayor que si sólo se obtiene un ovocito. En el segundo caso (un solo ovocito obtenido), la probabilidad de obtener al menos un embrión derivado de un espermatozoide con ADN intacto que fertilizó un ovocito normal o de un espermatozoide con ADN dañado que fertilizó un ovocito con alta capacidad de reparación de ADN será mucho más baja que en el primer caso (10 ovocitos obtenidos). En el primer caso, la selección de embriones y la transferencia de dos embriones aumenta significativamente la probabilidad de obtener al menos un embrión con ADN intacto a partir del cual se puede derivar un embarazo viable. Sin embargo, esto no invalida el valor de las pruebas de fragmentación de ADN en estas parejas. Por consiguiente, el número de ovocitos disponibles en metafase II es un factor importante que afecta el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN. Lo mismo aplicaría a ciclos naturales o de inseminación intrauterina (IIU) en los cuales la cantidad de ovocitos obtenidos es usualmente uno. En este escenario, las tasas de embarazo dependerían más del valor de la prueba de fragmentación de ADN, ya que la probabilidad de obtener un embrión con ADN intacto es más baja y, además, no se tiene la ventaja de transferir dos o tres embriones como en el caso de la FIV. Por tanto, el valor predictivo negativo de las pruebas de fragmentación de ADN debe ser mayor en ciclos naturales o de IIU. Esta hipótesis es consistente con los resultados del estudio de Duran y colaboradores,⁹⁰ en el que encontraron que los valores de fragmentación de ADN, estimados mediante la prueba TUNEL, se correlacionaron estrechamente con las tasas de embarazo en ciclos de IIU.

Para concluir, se propone que el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN, π_{test} , es la suma de varios factores: $\pi_{\text{test}} = \pi_{(1)} + \pi_{(2)} + \pi_{(3)} + \dots + \pi_{(n)}$, donde $\pi_{(n)}$ representa muchos de los factores discutidos previamente, y a cada factor se le puede dar un peso diferente.

APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD

¿Cuáles son las implicaciones de las pruebas de ADN espermático en el diagnóstico y tratamiento de la in-

fertilidad? La fertilización de ovocitos en metafase II por espermatozoides con daño al ADN podría resultar en defectos en el desarrollo embrionario, falla en la implantación, o en aumento en la tasa de aborto espontáneo.^{13,14,91-95} Los ovocitos maduros con mecanismos funcionales de reparación de ADN tienen la capacidad de reparar el daño moderado al ADN espermático.^{96,97} Sin embargo, los ovocitos cuyos mecanismos de reparación de ADN no son funcionales o que han sido dañados por factores endógenos (radicales libres) o exógenos (radiación, tóxicos ambientales) no serían capaces de reparar este daño.

Un aspecto importante que está surgiendo actualmente relacionado con las pruebas de fragmentación de ADN espermático es la existencia de subgrupos de parejas infértiles que acuden a clínicas de infertilidad con infertilidad de larga evolución o falla repetida a FIV sin una causa aparente en las cuales el daño “irreparable” al ADN espermático puede ser el factor limitante responsable de su problema de infertilidad. Esto puede ayudar a explicar, al menos en parte, por qué las tasas de embarazo en los primeros ciclos de TESA-ICSI son relativamente altas en estas parejas.⁷⁹ Estos datos sugieren que si el embarazo no tiene lugar en el primer ciclo TESA-ICSI, la causa de infertilidad en estas parejas puede estar en cualquier otra parte. Actualmente, existe cierta controversia respecto del valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN espermático en tecnología de reproducción asistida. Incluso al utilizar pruebas con un alto valor predictivo, como TUNEL mediante citometría de flujo, dada su baja especificidad, debida principalmente a la capacidad del ovocito de reparar el ADN espermático, los valores de fragmentación de ADN espermático no siempre se correlacionan con el resultado de embarazo. Algunos investigadores reportan tal correlación y otros no. En un informe reciente, Collins y colaboradores⁹⁸ concluyen que “la pequeña pero estadísticamente significativa asociación entre los resultados de las pruebas de integridad de ADN espermático y el embarazo en ciclos FIV e ICSI, no es suficientemente fuerte para proporcionar una indicación clínica para el uso rutinario de estas pruebas en la evaluación de la infertilidad masculina. Es posible que subgrupos aún por determinar de parejas infértiles puedan beneficiarse de las pruebas de integridad de ADN espermático.” Esta

evaluación implica que las pruebas de fragmentación de ADN espermático pueden ser aplicadas selectivamente a parejas con mal pronóstico en tecnología de reproducción asistida. Como se indicó, hay una serie de factores que afectan el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN, lo cual puede ayudar a responder esta pregunta. Sin embargo, tal vez la explicación más probable a esta aparente paradoja está relacionada con el tipo de daño al ADN: reparable *versus* irreparable. Por ejemplo, dos pacientes pueden tener el mismo valor de la prueba de fragmentación de ADN mediante TUNEL (por ejemplo, 50%); sin embargo, el pronóstico puede ser completamente diferente, ya que en un caso el daño al ADN puede ser reparable y en el otro no. Sin embargo, esto en sí mismo no explica por qué las tasas de embarazo serían tan bajas en el segundo caso. Para que esto aplique, todos los espermatozoides deben tener algún tipo de daño al ADN y este daño no puede ser reparado por el ovocito o el embrión. Debe aplicar un escenario de tipo “efecto *iceberg*”. Dado el hecho de que uno de los mecanismos más importantes de fragmentación del ADN espermático es el daño oxidativo durante el paso a través del epidídimo y, como se mencionó, de una combinación de daño a nucleótidos (por ejemplo, 8-OHdG y daño bicatenario al ADN), es posible que, en estas parejas, el daño al ADN afectaría la mayor parte de las células espermáticas, a pesar de que las pruebas actuales permiten medir sólo una fracción de este daño al ADN. Por consiguiente, el valor de 50% sería engañoso. Vale la pena considerar el concepto de que algunos pacientes con un tipo más grave de daño al ADN (por ejemplo, daño al ADN que no es reparable por el ovocito o el embrión) pueden beneficiarse de las pruebas de fragmentación de ADN y el uso de espermatozoides con valores bajos de fragmentación de ADN. Desafortunadamente, al menos en el escenario clínico, actualmente no están disponibles pruebas que permitan la diferenciación de estos tipos de daño al ADN. Sin embargo, recientemente el 2D-COMET se introdujo como una prueba nueva que puede distinguir entre estos dos tipos de daño.⁹⁹ Esta prueba puede ayudar a evaluar el efecto del daño bicatenario al ADN espermático en el resultado de embarazo de tecnología de reproducción asistida y aumentar la especificidad de las pruebas de fragmentación de ADN. Además del daño al ADN calculado mediante pruebas

como TUNEL, cometa, SCD o SCSA, con excepción de la prueba 8-OHdG, actualmente no están disponibles pruebas que midan otros tipos de daño al ADN (oxidativo y no oxidativo) que puedan estar presentes en el ADN espermático. Hasta que se desarrollen estas pruebas, la especificidad de las pruebas de fragmentación de ADN espermático continuará siendo baja.

Por tanto, con base en los factores que determinan el valor predictivo de las pruebas de fragmentación de ADN espermático, el valor clínico de las pruebas de fragmentación de ADN en la predicción del resultado de embarazo en tecnología de reproducción asistida debe basarse necesariamente en dos supuestos principales: 1) el daño al ADN debe afectar toda la población de espermatozoides en la muestra, y 2) el daño al ADN presente en estos espermatozoides no puede ser reparado por el ovocito. Si alguno de estos supuestos no se aplica, no podría esperarse correlación significativa entre un índice de fragmentación de ADN anormal y el resultado de embarazo en tecnología de reproducción asistida.

Como se indicó, otro aspecto importante de las aplicaciones clínicas de las pruebas de fragmentación de ADN es el uso de espermatozoides testiculares en pacientes con niveles altos de fragmentación de ADN espermático en el semen. En estos casos, debe recomendarse el uso de espermatozoides testiculares obtenidos mediante TESE o TESA.

Además del uso de espermatozoides testiculares, otra estrategia que puede utilizarse en pacientes con niveles altos de fragmentación del ADN espermático es la selección de espermatozoides con niveles bajos de daño al ADN. Aunque esta estrategia se aplicaría principalmente a espermatozoides eyaculados, también podría aplicarse a espermatozoides testiculares, ya que, como se mencionó, no todo el daño al ADN espermático es posttesticular. Actualmente se ha propuesto una serie de técnicas para seleccionar espermatozoides con niveles bajos de fragmentación de ADN. Éstas incluyen el uso de columnas anexina-V,^{100,101} las cuales han demostrado reducir significativamente el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN, según lo determinado por la prueba TUNEL y un método de selección de espermatozoides basado en la fijación de ácido hialurónico espermático.¹⁰² Otras técnicas incluyen la selección de espermatozoides desprovistos

de vacuolas superficiales mediante ICSI de alta magnificación¹⁰³ y la recientemente introducida tecnología de absorción confocal de la luz y espectroscopia de dispersión (CLASS, por sus siglas en inglés), la cual permite la visualización no invasiva de estructuras subcelulares.¹⁰³ Estas estructuras pueden identificarse mediante dos modos principales: visualización directa mediante la microscopia confocal o mediante su espectro específico. En relación con las aplicaciones del modo espectral en tecnología de reproducción asistida, se uniría un espectroscopio al microscopio invertido y el espectro de estructuras subcelulares, como la cromatina espermática, puede recogerse en menos de un segundo. Por consiguiente, la tecnología CLASS puede hacer posible, en un futuro cercano, seleccionar espermatozoides con cromatina intacta para ser microinyectados a través de ICSI. Sin embargo, debe tenerse cuidado en relación con los potenciales efectos perjudiciales del uso de estas técnicas no invasivas, ya que en algunas condiciones imprevistas puede inducirse daño. Debido a que en el caso de la tecnología CLASS el tiempo de selección espermática y de exposición a luz visible estaría limitado a alrededor de un segundo, esto es más probable que se aplique a la tecnología IMSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados), en la que el tiempo de selección espermática es significativamente mayor. Con respecto a la utilidad de IMSI en ART, un estudio reciente indica que los niveles de fragmentación de ADN, según lo evaluado mediante la prueba de dispersión de cromatina espermática, en espermatozoides individuales seleccionados mediante IMSI, son insignificantes en espermatozoides sin vacuolas (Gosalvez y col., resultados no publicados).

En conclusión, la fragmentación de ADN en el núcleo espermático generó una pléthora de artículos durante la década pasada. La distinción entre todos los espermatozoides afectados *versus* sólo los espermatozoides con “ADN dañado” es sumamente relevante para el manejo clínico de estos pacientes. En relación con la tecnología de reproducción asistida, la responsabilidad debe ahora cambiarse a la identificación de los espermatozoides con ADN dañado y cómo seleccionar poblaciones de espermatozoides o espermatozoide individuales “normales”. Finalmente, la presencia de espermatozoides con

ADN fragmentado es irrefutable cualesquiera que sean los mecanismos de su origen, el efecto en el embrión y la descendencia, y la necesidad de diagnosticarlo es un área crítica que requiere un conocimiento más profundo.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. Esther Velilla y a la Dra. Estefanía Toro por la asistencia técnica en la realización de la prueba TUNEL y al Dr. Ferrán García por la recuperación de espermatozoides testiculares en los estudios TESA-ICSI. También agradecen a la Dra. López-Teijón por sus valiosos comentarios y su apoyo incondicional en esta investigación.

Traducción: Adriana Jardón A

REFERENCIAS

1. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528-532.
2. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409-1417.
3. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59:1037-1046.
4. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, et al. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;27:176-188.
5. Harrouk W, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cyclophosphamide alters cell-cell contacts and activation of embryonic transcription in the preimplantation rat embryo. *Biol Reprod* 2000;63:74-81.
6. Harrouk W, Khatabaksh S, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cyclophosphamide dysregulates the gene activation program in rat preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2000;57:214-223.
7. Harrouk W, Codrington A, Vinson R, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. *Mutat Res* 2000;461:229-241.
8. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, et al. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005;20:1339-1348.
9. Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, et al. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 2007;14:175-183.

10. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *PNAS* 2006;103:9601-9606.
11. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008;17:392-397.
12. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004;19:611-615.
13. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-2881.
14. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378-383.
15. Shoukir Y, Chardonnes D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998;13:1632-1637.
16. Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, et al. Comparison of *in-vitro* development of embryos originating from either conventional *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:402-409.
17. Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006;21:2319-2328.
18. Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Ginsburg M, et al. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving *in vitro* fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril* 2007;87:1033-1040.
19. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226-230.
20. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1912-1921.
21. Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 2005;20:3101-3108.
22. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2:103-117.
23. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis *in vitro*. *Am J Physiol* 1999;276:310-316.
24. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-37.
25. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligoasthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004;19:2298-2302.
26. El-Domyati M, Al-Din A, Barakat M, El-Fakahany H, et al. DNA repair and apoptosis in testicular germ cells of ageing fertile males: the role of the poly(ADP-ribosyl)ation pathway. *Fertil Steril*. In press.
27. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, et al. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66:1061-1067.
28. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365-372.
29. Mahfouz RZ, Sharma RK, Poenicke K, Jha R, et al. Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Steril* 2008;91(5 Suppl):2210-2220.
30. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, et al. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7:469-476.
31. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, et al. Selection of non-apoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biol Reprod* 2006;74(3):530-537.
32. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2:127-133.
33. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993;37:109-128.
34. McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993;158:122-130.
35. McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992;31:268-279.
36. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004;70:910-918.
37. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. 1998;13:1864-1871.
38. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:896-900.
39. Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 2006;324:301-310.
40. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;129:505-514.

41. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007;625:20-28.
42. Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007;14:418-421.
43. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999;5:831-835.
44. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000;14:955-967.
45. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997;18:294-301.
46. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;49:1083-1088.
47. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002;25:255-261.
48. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008;23:1044-1052.
49. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-205.
50. Hughes C, Lewis S, McKelvey-Martin V, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996;2:613-619.
51. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52:864-867.
52. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2160-2165.
53. Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, et al. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 2000;453:77-82.
54. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
55. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-1133.
56. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma* 1980;78:225-238.
57. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-1722.
58. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
59. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, et al. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 1989;184:461-470.
60. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
61. Phillips KP, Baltz JM. Intracellular pH change does not accompany egg activation in the mouse. *Mol Reprod Dev* 1996;45:52-60.
62. Phillips KP, Leveille MC, Claman P, Baltz JM. Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2000;15:896-904.
63. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-179.
64. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998;52:252-258.
65. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol* 1994;42. Pt B:159-176.
66. Evenson D, Jost L, Gandour D, Rhodes L, et al. Comparative sperm chromatin structure assay measurements on epillumination and orthogonal axes flow cytometers. *Cytometry* 1995;19:295-303.
67. Evenson DP. Flow cytometry of acridine orange stained sperm is a rapid and practical method for monitoring occupational exposure to genotoxicants. *Prog Clin Biol Res* 1986;207:121-132.
68. Evenson DP. Flow cytometric analysis of male germ cell quality. *Methods Cell Biol* 1990;33:401-410.
69. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003;80:895-902.
70. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401-1408.
71. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22(1):174-179.
72. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:255-260.
73. Setchell BP, Ekpe G, Zupp JL, Surani MA. Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated. *Hum Reprod* 1998;13:342-347.

74. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284:696-704.
75. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:2279-2285.
76. Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M, de BP. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet* 2008;17:1922-1937.
77. Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, et al. DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* 2000;301:851-867.
78. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999;5:831-835.
79. Alvarez J. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del DNA espermático. *Revista Argentina de Andrología* 2008;5.
80. Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:337-342.
81. Gosalvez J, Cortes-Gutierrez EI, Nunez R, Fernandez JL, et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 2008.
82. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004;82:1443-1445.
83. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1191-1199.
84. Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity 1999;72:496-499.
85. Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, et al. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:740-747.
86. Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod* 1999;14:2015-2019.
87. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000;15:1112-1126.
88. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2160-2165.
89. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4:439-445.
90. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-3128.
91. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, et al. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992;89:181-186.
92. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality 1993;60:888-892.
93. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:1864-1871.
94. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-1049.
95. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003;49:49-55.
96. Matsuda Y, Tobarí I. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized *in vitro* with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS). *Mutat Res* 1988;198:131-144.
97. Brandriff B, Pedersen RA. Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science* 1981;211:1431-1433.
98. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with *in vitro* fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823-831.
99. Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernández JL, Gosálvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;18:609-616.
100. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, et al. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biol Reprod* 2006;74:530-537.
101. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005;10:740-746.
102. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665-1673.
103. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-1419.
104. Itzkan I, Qiu L, Fang H, Zaman MM, et al. Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live cells with no exogenous labels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17255-17260.