




Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**MICROBIOTA SEMINAL I  
INTEGRITAT DE L'ADN ESPERMÀTIC**

Memòria presentada per **Sergio Garcia Segura** per aspirar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorat en Biologia Cel·lular.

Bellaterra, Novembre de 2021



El Dr. Jordi Benet Català, Professor Catedràtic i la Dra. Maria Oliver Bonet, Professora del programa Beatriz Galindo, del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEN

Que Sergio Garcia Segura ha realitzat, sota la seva direcció, a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorat en Biologia Cel·lular, amb el títol:

**MICROBIOTA SEMINAL I  
INTEGRITAT DE L'ADN ESPERMÀTIC**

Jordi Benet Català

Maria Oliver Bonet

Bellaterra, Novembre de 2021



A tota la meva família,  
doncs la nit és fosca i alberga horrors,  
però vosaltres sou el far que m'il·lumina.



## AGRAÏMENTS

Vull deixar constància de la meva gratitud respecte a les persones que han fet possible la realització d'aquesta tesi doctoral. Als meus directors, Jordi i Maria, per confiar-me l'inici d'aquesta nova via de coneixement que, tot i ser un món desconegut per tots tres, crec que ha assentat les bases per una recerca que pot donar molts fruits en el futur. Gràcies per la llibertat absoluta que m'heu brindat per poder estudiar i desenvolupar tot allò que he plantejat. Per mi sempre sereu els meus mentors i la meva referència per a la carrera professional que m'espera. Ha estat un honor i un plaer ser el teu últim doctorant, Jordi.

Als integrants de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, gràcies per la vostra càlida acollida i per fer-me sentir part d'un equip meravellós. Tot i ser l'únic doctorant en actiu a la unitat durant gairebé tota la meva estada, no m'he sentit sol, doncs he tingut el vostre suport en tot moment. També a en Jordi Ribas per tot el que m'ha ensenyat del laboratori i de comunicació científica. En especial, vull donar el meu més sentit agraïment a en Javi i l'Àngels per compartir amb mi tots els moments més durs i feliços que he passat a la unitat i, sobretot, per tot el coneixement en tècniques i procediments del laboratori que m'heu transmès. M'emporto una manera de treballar al laboratori que em servirà per tota la vida. Javi, eres uno de los mejores investigadores que he conocido y tu pasión por la ciencia me fascina. Sabes que una parte de la tesis te la debo a ti, directa o indirectamente. No en vano te considero otro de mis mayores referentes profesionales, pero, sobre todo, un gran amigo.

Als companys de CIMAB, per la seva gran aportació en el desenvolupament d'aquesta tesi. D'ells és el mèrit de l'anàlisi de fragmentació de l'ADN espermàtic i de la meva formació en aquest camp. Gràcies per tot el que he après de tu, Agustín, que no és poc, i gràcies Sandra per ser la millor



companya doctoranda que he pogut tenir. Us desitjo molta sort en el futur i no voldria perdre el contacte amb vosaltres.

A l'equip de Coagulopaties Congènites del Banc de Sang i Teixits de Barcelona: Iris, Laia, Carlos, Irene i Fran, que gràcies a ells he pogut obrir-me pas en l'inhòspit món de la microbiota i la bioinformàtica. Heu estat claus en la part més dura d'aquesta tesi. Menció també als companys del Servei Veterinari de Genètica Molecular que ens van assessorar amb tant encert a l'inici d'aquesta muntanya russa.

Però no tot el treball fet en aquesta tesi parteix del laboratori. Hi ha un gran component emocional sense el que no hagués pogut tirar endavant tota aquesta feina. Moltíssimes gràcies a tots els amics que sempre heu estat amb mi, en els moments bons i en els dolents, perquè heu estat un suport irremplaçable sense el que no hagués pogut avançar. A tu també, Júlia, que m'has donat l'empenta final que necessitava per superar els últims mesos.

Dejo lo mejor para el final, pues nada de esto podría haber sido posible sin mi mayor apoyo: mi familia. Infinitas gracias a todos por ser el motor que me hace avanzar y ser mejor cada día. No merezco todo el cariño que me dais y no sabéis lo importantes que sois para mí. A mis abuelos, los que están y los que no, porque, aunque no entendáis nada de este complejo trabajo, es un gran homenaje para vosotros. A Laura, porque todo esto lo hago por ti, porque eres la razón de esforzarme cada día. Tú has sufrido la que más todo el proceso y, te puedo asegurar, que sin ti no podría haber acabado. Que este trabajo sirva como base para construir todo nuestro futuro. Y a mis padres y hermana les debo todo. Esto es el culmen de todo vuestro esfuerzo para formarme como persona y a vosotros os dedico este trabajo. He dado todo lo que ha estado en mí académicamente para agradeceróslo y, aunque no siempre os lo haga saber, os quiero, mucho.

Moltes gràcies a tots.

Agraïments a les entitats que han donat suport a aquest projecte:

- Fons de Desenvolupament Regional Europeu i Institut de Salut Carlos III: projecte PI14/00119
- Generalitat de Catalunya: projecte 2017 SGR-1796
- Universitat Autònoma de Barcelona: beca predoctoral de Personal Investigador en Formació (PIF) 2016
- Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona
- Banc de Sang i Teixits de Barcelona



Do I contradict myself?

Very well then I contradict myself.

I am large, I contain multitudes.

Walt Whitman, Song of Myself



**ÍNDEX**



## Continguts

---

Resum.....	21
<b>1. Introducció.....</b>	<b>25</b>
1.1. Infertilitat humana i implicació del factor masculí.....	27
1.2. L'espermatozoide.....	29
1.2.1. Espermatogènesi.....	30
1.2.2. L'ADN espermàtic.....	31
1.2.3. Context ambiental seminal.....	34
1.3. La microbiota.....	35
1.3.1. Microbiota en el tracte reproductiu femení.....	37
1.3.2. Microbiota en el tracte reproductiu masculí.....	39
1.3.3. Efecte de la microbiota seminal en la fertilitat.....	43
1.3.4. Infeccions i sistema immunitari.....	46
1.4. Marcadors d'infertilitat masculina.....	47
1.4.1. El seminograma.....	48
1.4.2. Fragmentació de l'ADN espermàtic.....	51
1.4.2.1. Estrès oxidatiu.....	53
1.4.2.2. Apoptosi i activació d'enzims hidrolítics.....	55
1.4.2.3. Alteracions de l'empaquetament de l'ADN espermàtic.....	56
1.4.2.4. Exposició a agents fisicoquímics.....	57
1.4.2.5. Estil de vida.....	59
1.4.3. Tècniques d'anàlisi de la fragmentació de l'ADN espermàtic.....	60
1.4.3.1 Assaig Terminal transferase dUTP Nick-End Labelling.....	60
1.4.3.2. Assaig Comet.....	62
1.4.4. Microbiota seminal.....	64
1.4.4.1. Consideracions experimentals d'un estudi de la microbiota.....	65
1.4.4.2. Consideracions especials de les mostres seminals.....	67



1.4.4.3. Mètodes de caracterització de la microbiota per seqüenciació d'amplicó.....	68
1.4.4.3.1. Seqüenciació de segona generació: Illumina MiSeq.....	69
1.4.4.3.2. Seqüenciació de tercera generació: ONT MinION.....	71
1.4.4.4. Big data: gestió i processament de dades massives.....	73
<b>2. Hipòtesi i objectius.....</b>	<b>77</b>
<b>3. Material i mètodes.....</b>	<b>81</b>
3.1. Recollida i emmagatzematge de mostres.....	83
3.1.1. Procedència.....	83
3.1.2. Consentiment informat i comitè d'ètica.....	83
3.1.3. Grups de pacients i controls.....	83
3.1.4. Protocol d'obtenció de mostres de semen.....	84
3.1.5. Criopreservació i descongelació de mostres de semen.....	85
3.2. Tècniques d'anàlisi seminal.....	86
3.2.1. Seminograma.....	86
3.2.2. Fragmentació de l'ADN espermàtic.....	88
3.2.2.1. Assaig TUNEL.....	88
3.2.2.2. Assaig Comet.....	92
3.2.3. Potencial oxidant-reductor mitjançant MiOXSYS.....	94
3.2.4. Test de la Cromomicina A3.....	95
3.3. Disseny experimental per a l'estudi de la microbiota seminal.....	98
3.3.1. Extracció i purificació d'ADN bacterià.....	99
3.3.2. Amplificació del gen <i>16S</i> i preparació de la llibreria genètica de la plataforma ONT.....	101
3.3.3. Preparació de la llibreria genètica de la plataforma Illumina.....	106
3.3.4. Seqüenciació de les mostres.....	110
3.3.5. Anàlisi bioinformàtica.....	113
3.3.5.1. Posada a punt de l'anàlisi informàtica de la microbiota seminal.....	115

3.3.5.1.1. Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma Illumina.....	115
3.3.5.1.2. Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma ONT.....	119
3.3.6. Anàlisi estadística.....	122
<b>4. Resultats i discussió.....</b>	<b>123</b>
4.1. Objectiu 1: Posada a punt i valoració del sistema MiOXSYS.....	125
4.2. Objectiu 2: Relació entre els biomarcadors d'infertilitat masculina.....	128
4.3. Objectiu 3: Posada a punt de l'anàlisi informàtica de la microbiota seminal.....	135
4.3.1. Objectiu 3.1: Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma Illumina.....	136
4.3.2. Objectiu 3.2: Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma ONT.....	139
4.4. Objectiu 4: Caracterització bacteriana del semen.....	143
4.4.1. Gèneres i famílies bacterianes identificades per Illumina.....	146
4.4.2. Gèneres i famílies bacterianes identificades per ONT.....	149
4.4.3. Visió global de la composició microbiana seminal.....	149
4.5. Objectiu 5: Estudi de relació entre la microbiota seminal i la infertilitat.....	155
4.5.1. Microbiota seminal, edat i hàbits de consum.....	155
4.5.2. Microbiota seminal i grups clínics.....	157
4.5.3. Microbiota seminal i seminograma.....	160
4.5.4. Microbiota seminal i integritat de l'ADN espermàtic.....	165
4.5.5. Implicació dels bacteris en la infertilitat masculina.....	169
<b>5. Conclusions.....</b>	<b>177</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>181</b>
Annex 1. Consentiment informat.....	233
Annex 2. Qüestionari sobre historial mèdic i hàbits de consum.....	237
Annex 3. Article publicat.....	241

## Llista de caixes de conceptes

---

Caixa de conceptes 1: Microbiota.....	36
Caixa de conceptes 2: Seqüenciació.....	101
Caixa de conceptes 3: Programari informàtic utilitzat.....	114

## Llista de taules

---

Taula 1. Metodologies emprades en la caracterització de la microbiota seminal.....	42
Taula 2. Principals associacions entre la microbiota i els paràmetres seminals i espermàtics.....	45
Taula 3. Valors de referència dels paràmetres seminals i espermàtics valorats al seminograma segons l'Organització Mundial de la Salut.....	87
Taula 4. Seqüència dels <i>primers</i> degenerats utilitzats per amplificar el gen ribosomal <i>16S</i> complet.....	102
Taula 5. Reactius i condicions de la primera amplificació per PCR del gen ribosomal <i>16S</i> .....	102
Taula 6. Reactius i condicions de la segona amplificació per PCR del gen ribosomal <i>16S</i> .....	104
Taula 7. Composició de les barreges de reactius del kit NGSgo.....	108
Taula 8. Programa de temperatures del termociclador per a la preparació de llibreries genètiques de la plataforma Illumina.....	108
Taula 9. Programa del termociclador per a la indexació de mostres de la plataforma Illumina.....	109
Taula 10: Estadística descriptiva de sORP1 i sORP2 de cada mostra al dispositiu MiOXSYS i estudi de relació entre elles.....	126
Taula 11. Distribució dels paràmetres seminals de les mostres de pacients idiopàtics.....	129
Taula 12. Anàlisi de correlació dels índex sORP amb els paràmetres seminals i espermàtics.....	130
Taula 13. Anàlisi de correlació dels paràmetres de fragmentació d'ADN espermàtic (SDF) i del test de cromomicina A3 (CMA3) amb els paràmetres seminals i espermàtics.....	131
Taula 14. Composició microbiana de la <i>mock community</i> comercial "ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard".....	135

Taula 15. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus fèrtils i de població general.....	157
Taula 16. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus fèrtils i infèrtils.....	158
Taula 17. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus general i infèrtils.....	159
Taula 18. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus control i infèrtils.....	159
Taula 19. Correlacions entre els paràmetres del seminograma i els grups bacterians.....	162
Taula 20. Correlacions entre els paràmetres d'integritat de l'ADN i els grups bacterians.....	165

## Llista de figures

---

Figura 1. Imatge histològica d'un tall transversal dels túbuls seminífers d'un testicle humà i esquema cel·lular del procés d'espermatogènesi.....	31
Figura 2. Model d'organització de la cromatina espermàtica.....	33
Figura 3. Distribució del nombre i la massa dels diferents tipus cel·lulars del cos humà d'un home adult de 70 Kg.....	36
Figura 4. Diagrama esquemàtic dels tipus de trencaments de l'ADN espermàtic.....	52
Figura 5. Exemple de la reacció que es produeix durant l'assaig TUNEL.....	61
Figura 6. Esquema molecular del procés portat a terme durant l'assaig Comet...	63
Figura 7. Representació del gen ribosomal <i>16S</i> .....	68
Figura 8. Base metodològica de la seqüenciació per síntesi d'Illumina.....	70
Figura 9. Representació gràfica d'un nanoporus situat a la membrana d'una flowcell de MinION.....	72
Figura 10. Resultat d'una electroforesi dels productes de la segona amplificació per PCR.....	105
Figura 11. Fotografia del robot Hamilton Microlab Star M en funcionament...	107
Figura 12. Seqüenciador MiSeq d'Illumina.....	110
Figura 13. Col·locació d'una <i>flow cell</i> en el seqüenciador MinION.....	112

Figura 14. <i>Flow cell</i> de la plataforma de seqüenciació de Oxford Nanopore Technologies.....	112
Figura 15. Gràfiques extretes del programa CLC Genomics Workbench d'una mostra control <i>mock community</i> .....	118
Figura 16. Distribució de les diferències entre sORP1 i sORP2 pacients infèrtils idiopàtics segons els valors de pH seminal de cada mostra.....	126
Figura 17. Esquema de l'evolució dels paràmetres espermàtics i seminals segons el model teòric proposat.....	133
Figura 18. Abundància relativa dels filums identificats en la <i>mock community</i> per la plataforma de seqüenciació Illumina.....	137
Figura 19. Abundància relativa de les famílies i gèneres bacterians identificats en la <i>mock community</i> per la plataforma de seqüenciació Illumina.....	138
Figura 20. Abundància relativa dels filums identificats en la <i>mock community</i> per la plataforma de seqüenciació ONT.....	141
Figura 21. Abundància relativa de les famílies i gèneres bacterians identificats en la <i>mock community</i> per la plataforma de seqüenciació ONT.....	142
Figura 22. Distribució del número de lectures obtingudes amb bona qualitat per cada plataforma de seqüenciació.....	143
Figura 23. Famílies bacterianes identificades en els controls negatius realitzats al llarg del procediment de seqüenciació.....	144
Figura 24. Mapa de calor de les abundàncies relatives dels filums bacterians identificats en mostres seminals.....	145
Figura 25. Mapa de calor de les abundàncies relatives de les famílies bacterianes identificades a les mostres seminals.....	147
Figura 26. Mapa de calor de les abundàncies relatives del gèneres bacterians identificats a les mostres seminals.....	148
Figura 27. Gèneres bacterians identificats en cada plataforma de seqüenciació.....	149
Figura 28. Distribució de les abundàncies relatives dels gèneres més abundants presents a les mostres seminals.....	151
Figura 29. Arbre filogenètic dels bacteris identificats més abundants en les mostres seminals.....	154

## RESUM

El cos humà està colonitzat per bacteris comensals que habiten superfícies i fluids de l'organisme, una comunitat coneguda com a microbiota, amb implicacions en la salut humana. La presència o absència de determinades espècies bacterianes altera el funcionament fisiològic, fet que ha impulsat estudis dirigits a conèixer el seu paper en algunes malalties, com per exemple la infertilitat.

Sota la hipòtesi que la microbiota pot alterar paràmetres seminals i espermàtics associats a la infertilitat masculina, s'han proposat un seguit d'objectius per a estudiar-ho. S'han valorat paràmetres relacionats amb la integritat de l'ADN espermàtic com l'estat de compactació de la cromatina, la fragmentació de l'ADN o l'estrès oxidatiu, juntament amb els paràmetres clínics d'un seminograma. En primer lloc, s'ha valorat la relació entre aquests paràmetres per, a continuació, caracteritzar la microbiota seminal a través de la seqüenciació del gen ribosomal *16S* complet mitjançant les plataformes MiSeq d'Illumina i MinION d'Oxford Nanopore Technologies, i buscar-hi associacions amb els paràmetres valorats.

S'han pogut establir relacions entre un biomarcador recentment descrit, el potencial oxidant-reductor, i altres paràmetres més coneguts com el pH, l'estat de compactació de la cromatina o la fragmentació d'ADN. S'ha descrit la composició bacteriana seminal, integrada principalment per *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, i s'han establert relacions entre alguns gèneres i famílies amb els paràmetres de qualitat seminal.

## RESUMEN

El cuerpo humano está colonizado por bacterias comensales que habitan superficies y fluidos del organismo, una comunidad conocida como microbiota, con implicaciones en la salud humana. La presencia o ausencia de determinadas especies bacterianas altera el funcionamiento fisiológico, lo que ha impulsado estudios dirigidos a conocer su papel en algunas enfermedades, como por ejemplo la infertilidad.

Bajo la hipótesis de que la microbiota puede alterar parámetros seminales y espermáticos asociados a la infertilidad masculina, se han propuesto una serie de objetivos para estudiarlo. Se han valorado parámetros relacionados con la integridad de l'ADN espermático como el estado de compactación de la cromatina, la fragmentación de l'ADN o el estrés oxidativo, junto con los parámetros clínicos de un seminograma. En primer lugar, se ha valorado la relación entre estos parámetros para, a continuación, caracterizar la microbiota seminal a través de la secuenciación del gen ribosomal *16S* completo mediante las plataformas MiSeq de Illumina y MinION de Oxford Nanopore Technologies, buscando asociaciones con los parámetros valorados.

Se han podido establecer relaciones entre un biomarcador recientemente descrito, el potencial oxidante-reductor, y otros parámetros más conocidos como el pH, el estado de compactación de la cromatina o la fragmentación d'ADN. Se ha descrito la composición bacteriana seminal, integrada principalmente por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, y se han establecido relaciones entre algunos géneros y familias con los parámetros de calidad seminal.

## ABSTRACT

The human body is colonized by commensal bacteria that inhabit the body's surfaces and fluids, a community known as microbiota, with implications for human health. The presence or absence of certain bacterial species alters physiological functioning, which has led to studies aimed at understanding their role in some diseases, such as infertility.

Under the hypothesis that the microbiota may alter seminal and sperm parameters associated with male infertility, some objectives have been proposed. Parameters related to sperm DNA integrity such as chromatin compaction, DNA fragmentation, or oxidative stress have been assessed, along with the clinical parameters of a seminogram. The relationship between these parameters was first assessed, and then seminal microbiota was characterized through full-length *16S* ribosomal gene sequencing using Illumina MiSeq and Oxford Nanopore Technologies MinION platforms, and relationship was assessed with the rated parameters.

Relationships have been established between a recently described biomarker, oxidation-reduction potential, and other better-known parameters such as pH, chromatin compaction, or DNA fragmentation. The seminal bacterial composition, composed mainly of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria*, has been described, and relationships have been established between some genus and families with the seminal quality parameters.





## **1. INTRODUCCIÓ**



### **1.1. Infertilitat humana i implicació del factor masculí**

La infertilitat és un problema de salut pública actualment en augment i que afecta a la població humana a nivell global. És considerada per l'Organització Mundial de la Salut com una malaltia del sistema reproductiu, definida per la impossibilitat d'aconseguir un embaràs natural després de 12 mesos o més de mantenir relacions sexuals regulars sense protecció anticonceptiva. Aquest temps mínim s'ha establert després de constatar que aproximadament el 85% de les parelles amb desig reproductiu aconsegueix una concepció durant el primer any. La meitat de les parelles que no ho aconsegueixen tenen èxit durant els 12 mesos següents, de manera que la taxa de concepció acumulada en dos anys és del 93% (Sociedad Española de Fertilidad, 2007). Cal destacar que el concepte d'infertilitat també inclou a parelles que, tot i aconseguir un embaràs, pateixen avortaments de repetició sense arribar amb èxit al part.

Existeixen dos graus d'infertilitat segons el moment en que aquesta es fa evident. Quan la infertilitat apareix durant el primer intent de concepció de la parella es parla d'infertilitat primària, mentre que si es manifesta després d'aconseguir prèviament una gestació natural, ja sigui amb la mateixa parella o amb una anterior, es considera infertilitat secundària.

En base a dades de la passada dècada, aproximadament 48,5 milions de parelles a nivell global són infèrtils, malgrat alguns estudis estimen que el número podria ser superior (Boivin *et al.*, 2007; Mascarenhas *et al.*, 2012; Fainberg i Kashanian, 2019). La incidència, però, no és igual a tot el món. Els països desenvolupats semblen tenir unes taxes més elevades probablement com a conseqüència de la contaminació ambiental, el retràs de l'edat de maternitat o l'estrès. Un exemple és Europa, amb un 15% de parelles amb problemes per concebre i un 7,5% d'homes infèrtils (Jungwirth *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2015; Gliozheni *et al.*, 2020). Espanya es troba dins la mitjana de la Unió Europea i és un dels països amb més activitat en reproducció

assistida, amb un increment de la demanda tant nacional com internacional (Inhorn i Patrizio, 2015; Sociedad Española de Fertilidad, 2018; Gliozheni *et al.*, 2020).

Davant aquestes xifres es fa necessari explorar l'origen d'aquest problema. S'estima que entre el 20 i el 30% dels casos són causats únicament per factors masculins, mentre que en el 30-35% la causa única són factors femenins. En un 20-30% dels casos s'han identificat problemes tant en l'home com en la dona i en un 15% no se n'ha detectat l'origen i es cataloga com a idiopàtic (de Kretser, 1997; Boivin *et al.*, 2007; Ombelet *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2015). Així, s'estima que la infertilitat masculina està present en el 50% dels casos totals, aproximadament.

Les causes del factor masculí no sempre són fàcils d'identificar, doncs 1 de cada 4 homes infèrtils queden sense un diagnòstic clar (Poongothai *et al.*, 2009). Les causes conegudes són molt diverses però poden ser agrupades segons el tipus d'afectació.

En primer lloc trobem les causes fisicoquímiques que engloben tots els problemes derivats de defectes estructurals i mecànics i d'exposicions ambientals. La causa més comú d'infertilitat masculina és el varicocele, una dilatació de les venes del plexe pampiniforme de l'escrot que es troben al llarg del cordó espermàtic. Aquesta inflamació produeix un increment de la temperatura dels testicles i de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que afecten directament al procés de formació d'espermatozoides i a la integritat del material genètic del mateix. Es diagnostica en el 35% dels pacients amb infertilitat primària i en més del 80% dels homes amb infertilitat secundària (Alsaikhan *et al.*, 2016). Altres causes físiques habituals són les degudes per anomalies estructurals com la criptorquídia o les obstruccions dels conductes genitals, diagnosticades en el 12% dels casos i que dificulten la producció o l'alliberament dels gàmetes respectivament. Un altre exemple és la impotència, que impedeix l'acte sexual de forma

mecànica, ja sigui per problemes musculars o psicològics, i afecta al 10-15% de tots els homes (Poongothai *et al.*, 2009). Normalment, són afectacions fàcils de diagnosticar perquè s'identifiquen amb una simple exploració clínica.

En segon lloc hi ha un conjunt de causes moleculars que també estan implicades en la pèrdua de la capacitat fèrtil, relacionades amb desequilibris hormonals o estrès oxidatiu. Les fallades testiculars produïdes per concentracions elevades d'hormona luteïnitzant (LH) i d'hormona fol·liculostimulant (FSH) o disminuïdes d'esteroides gonadals produeixen una pèrdua de les cèl·lules encarregades de l'espermatogènesi, desordres presents en el 9% dels homes infèrtils (Poongothai *et al.*, 2009).

Finalment, trobem les causes cel·lulars, amb implicació tant de bacteris com de cèl·lules immunitàries o fins i tot dels propis gàmetes masculins, els espermatozoides. Com es veurà més endavant, les infeccions bacterianes i els leucòcits poden generar afectacions sobre els espermatozoides, però aquests també poden presentar defectes genètics com desordres cromosòmics i mutacions, o defectes de fertilització quan es veuen alterats els mecanismes de capacitació i hiperactivació, el reconeixement i unió a la zona pel·lúcida o la reacció acrosòmica.

En definitiva, la majoria de les causes de la infertilitat masculina impliquen d'alguna manera als gàmetes. L'espermatozoide esdevé, per tant, una peça clau a l'hora d'entendre millor l'etiologia d'aquesta malaltia.

## **1.2. L'espermatozoide**

L'espermatozoide o gàmeta masculí és la cèl·lula reproductora masculina, encarregada de transportar i protegir la seva dotació genètica haploide fins a l'òocit per a fecundar-lo i formar el zigot, que originarà un nou individu diploide. És una cèl·lula molt especialitzada que presenta una morfologia molt característica, dividida en tres parts: cap, peça intermèdia i cua. El cap

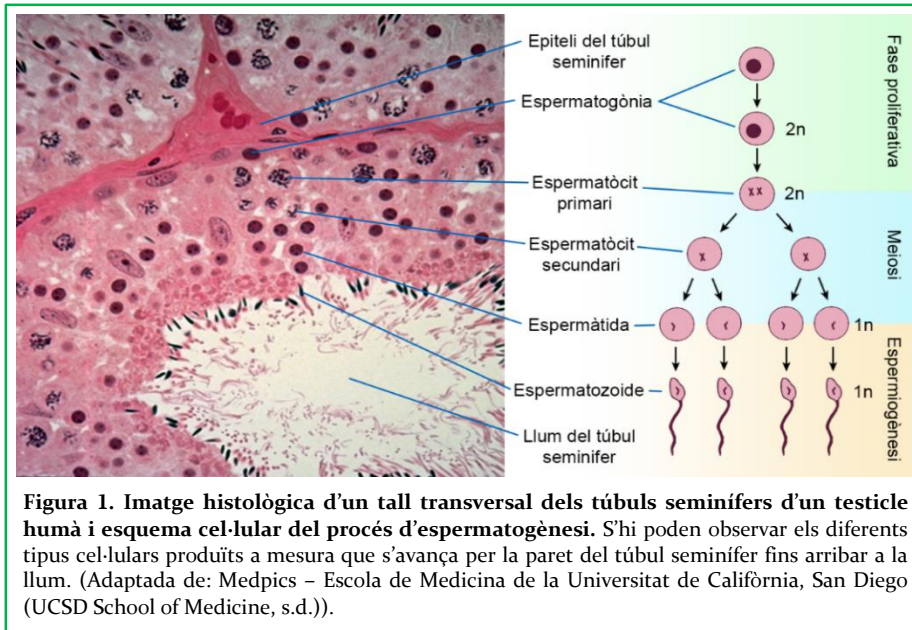
conté principalment dos estructures: l'acrosoma, que ocupa els dos terços anteriors, i el nucli, que conté el material genètic. La peça intermèdia és l'estructura que uneix el flagel al cap i conté tots els components citoplasmàtics de la cèl·lula, principalment mitocondries que proveeixen d'energia al flagel. Finalment, la cua està formada bàsicament per un flagel d'uns 35 µm de llargada que genera un moviment ondulatori-rotatori en tres dimensions que permet el desplaçament de la cèl·lula pel medi.

### **1.2.1. Espermatogènesi**

L'espermatogènesi és el procés de producció d'espermatozoides mitjançant mecanismes de divisió i diferenciació cel·lular de les cèl·lules germinals primordials. Té lloc en els túbuls seminífers, uns conductes de 0,2 mm de diàmetre ubicats a l'interior dels testicles. Es produeix de forma ininterrompuda des de l'inici de la pubertat amb nous cicles cada 16 dies. L'espermatogènesi humana té una durada d'uns 64-74 dies, que es divideixen en tres fases: la fase proliferativa, la meiosi i l'espermiogènesi (Adler, 1996; Divya *et al.*, 2014).

El procés s'activa per acció de la hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) sobre les cèl·lules germinals primordials masculines o espermatogònies, cèl·lules mare diploides localitzades a l'epiteli dels túbuls seminífers (Figura 1). Durant la fase proliferativa, les espermatogònies es divideixen mitòticament donant lloc a dues línies cel·lulars: noves espermatogònies per mantenir la línia germinal a l'epiteli i una nova línia cel·lular que s'endinsa a l'interior de la paret del túbul, els espermatòcits primaris.

Envoltats ara per les cèl·lules de Sertoli que formen les parets dels túbuls seminífers, els espermatòcits inicien un cicle de divisió meiótica, el resultat del qual són unes cèl·lules haploides anomenades espermàtides (Figura 1). A més de reduir a la meitat el número de cromosomes, durant la meiosi també es produeix un fenomen de recombinació genètica on els cromosomes



homòlegs s'intercanvien material genètic, generant així variabilitat genètica en cada espermatida. El procés de recombinació és fonamental per assegurar la correcta segregació meiótica dels cromosomes.

Finalment, a l'espermiogènesi les espermatides pateixen un procés de diferenciació i especialització cel·lular que consisteix en diverses modificacions morfològiques com la generació del flagel o la reducció del citoplasma per a donar lloc a l'espermatozoide madur. Aquest serà alliberat en la llum dels túbuls seminífers i transportat pel vas deferent fins a l'epidídim, on serà emmagatzemat i finalitzarà la seva maduració adquirint el potencial de fertilització.

### 1.2.2. L'ADN espermàtic

Una de les característiques més diferencials dels espermatozoides respecte de la resta de cèl·lules somàtiques del cos humà és l'estructura del nucli i l'organització del material genètic que conté. Per protegir l'ADN de l'espermatozoide d'interferències externes durant el seu viatge cap a l'òocit, la cromatina espermàtica pateix una modificació important durant



l'espermioogènesi amb l'augment del seu grau de compactació i, addicionalment, la reducció de la mida de l'espermatozoide, facilitant així la seva mobilitat (Gomendio i Roldan, 2008; Lüke *et al.*, 2014; Utsuno *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2019).

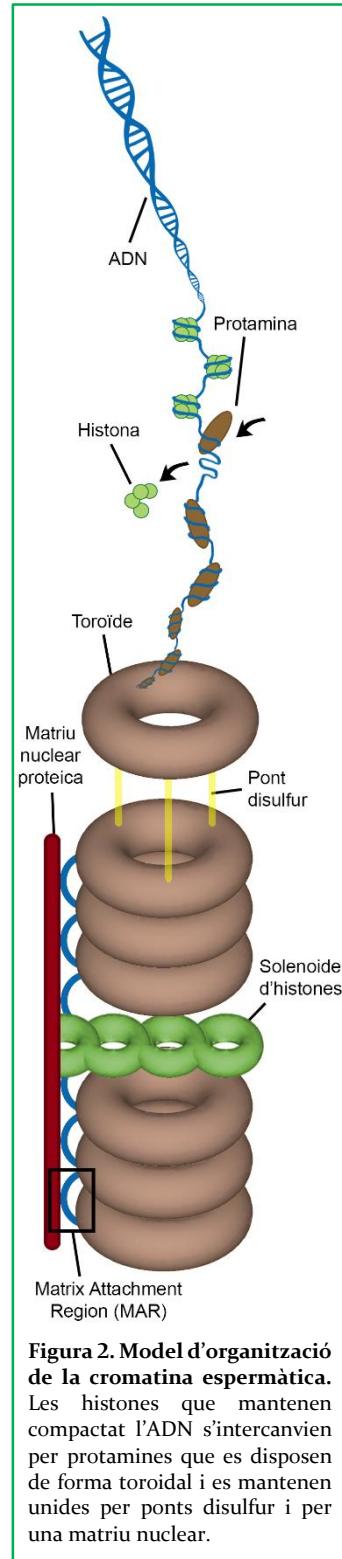
Les espermatogònies mantenen empaquetat el seu ADN amb unes proteïnes anomenades histones. Durant el procés de maduració espermàtica es substitueixen aproximadament el 85% de les histones per unes altres proteïnes amb propietats semblants però molt més reduïdes de mida, les protamines. Aquestes són unes molècules d'uns 5-8 kDa amb un alt contingut en arginines carregades positivament que li permeten una forta unió amb l'ADN i neutralitzen la seva càrrega negativa; i una quantitat significativa de cisteïnes que permeten crear ponts disulfur entre elles (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000). El model d'ordenació acceptat actualment (Ward i Coffey, 1991; Ward, 2010, 2018) proposa un primer nivell d'organització que implica la compactació i organització passiva de l'ADN i protamines en toroides de 50 kb amb l'ADN situat a l'interior de l'estructura (Figura 2) (Hud *et al.*, 1993, 1995; Brewer *et al.*, 2003; Hud i Vilfan, 2005). En un segon nivell d'organització, els toroides adjacents s'uneixen entre ells mitjançant ponts disulfur que estableixen la cromatina en una estructura semblant a la cristal·lina (Figura 2) (Balhorn *et al.*, 1991; Mudrak *et al.*, 2009). Aquesta arquitectura impedeix que el material genètic sigui transcripcionalment actiu perquè el seu grau de compactació el fa inaccessible fins i tot per a la pròpia maquinària cel·lular.

El tercer nivell d'organització consisteix en la unió de les cadenes de toroides a una estructura proteica anomenada matriu nuclear. En les cèl·lules somàtiques el material genètic també s'ancora cada 20-120 kb a una matriu nuclear proteica formant estructures en forma de solenoide que anomenem dominis, amb funcions específiques que regulen la replicació o la transcripció gènica (Dijkwel i Hamlin, 1996; Ostermeier, 2003). En espermatozoides

s'han trobat evidències de que cada toroide contindria un únic domini, recolzant la hipòtesi de que també en aquestes cèl·lules es conserva una estructura semblant (Ward, 1993; Sotolongo *et al.*, 2005). Els fragments d'unió entre toroides amb associació a histones serien, doncs, els punts d'unió amb la matriu nuclear o *Matrix Attachment Regions* (MAR) (Figura 2). La matriu nuclear sembla tenir un paper important en la formació i replicació del pronucli masculí després de la fecundació (Kramer i Krawetz, 1996; Ward *et al.*, 1999; Shaman *et al.*, 2007).

Finalment, dins el nucli la cromatina no està disposada de manera aleatòria. Zalensky va demostrar que la cromatina espermàtica es disposa de manera que els centròmers dels cromosomes es posicionen prop del centre del nucli i els telòmers al voltant de la perifèria (Zalenskaya *et al.*, 2000; Churikov *et al.*, 2004; Solov'eva *et al.*, 2004). A més, cada cromosoma sembla ocupar un territori que no es solapat per altres cromosomes adjacents (Mudrak, 2005; Zalensky i Zalenskaya, 2007).

Tot i que la compactació es produeix majoritàriament per protamines, les darreres dècades d'investigació han aportat evidències que no totes les histones són retirades durant la remodelació nuclear. S'han trobat dos tipus de regions que encara semblen conservar



l'organització original, amb l'ADN associat preferentment a histones. Per una banda, regions que contenen gens específics importants durant l'inici del desenvolupament o d'altres relacionats amb la síntesi de protamines (Arpanahi *et al.*, 2009; Hammoud *et al.*, 2009), i que necessiten ser accessibles a la maquinaria transcripcional. Per l'altra banda, regions molt petites disperses per tot el genoma que, segons Sotolongo i col·laboradors, es correspondrien amb els fragments d'unió entre toroides, els quals són altament sensibles a nucleases (Sotolongo *et al.*, 2003). Altres autors suggereixen que aquestes regions formen part de la informació epigenètica transmesa a l'oòcit fecundat. A favor d'aquesta hipòtesi hi ha el fet demostrat que algunes histones amb modificacions específiques també estan presents al pronucli patern després de la fertilització, suggerint que és possible que no siguin mai reemplaçades (van der Heijden *et al.*, 2006, 2008).

El material genètic de l'espermatozoide, però, no està compost únicament per l'ADN nuclear. L'ADN present a les mitocondries de la peça intermèdia també té un paper en el manteniment de la cèl·lula. Contràriament a l'ADN nuclear, l'ADN mitocondrial no es troba compactat ni per histones ni per protamines, sent així molt més susceptible al dany (Sawyer *et al.*, 2001). Tot i així, aquest material genètic conté majoritàriament gens involucrats en la producció d'ATP en el mateix mitocondri per aportar energia al flagel. A més, els mitocondris de l'espermatozoide són degradats després de la fecundació de l'oòcit i no formaran part funcional del zigot. Per això, la seva implicació en la fertilitat es creu que està principalment limitada a la mobilitat espermàtica (Amaral *et al.*, 2013).

### **1.2.3 Context ambiental seminal**

Les cèl·lules reproductores masculines es troben en suspensió formant part del semen. El plasma seminal n'és la part fluida, el qual representa més del 90% del volum ejaculat, i està compost per una barreja de secrecions de l'epidídim, la pròstata, les vesícules seminals i les glàndules bulbouretrals i

periuiretrals. És un medi lleugerament bàsic (pH 7.2-8) amb una temperatura igual a la del cos humà (36-37°C) i enriquit en biomolècules com lípids, polisacàrids, glicans, ions inorgànics, components immunitaris, enzims, àcids nucleics, proteïnes i pèptids, els quals contribueixen a la seva viscositat.

Els espermatozoides produïts pels testicles constitueixen només el 2-5% del volum total i s'emmagatzemen en l'epidídim en un medi que tot just conté potassi, sodi i glicerilfosforilcolina. Durant l'ejaculació, les vesícules i glàndules esmentades contribueixen amb l'addició d'antioxidants com l'ergotioneïna, hormones prostaglandines, fructosa i la resta de metabòlits necessaris per al bon funcionament de la cèl·lula reproductora (Encyclopedia Britannica, 2021). Per exemple, el magnesi i el potassi en petites quantitats són essencials per a la motilitat espermàtica, mentre els sulfats prevenen que les cèl·lules s'inflin de líquid per osmosi. Per la seva banda, els glúcids, principalment la fructosa, són els nutrients dels quals s'obté l'energia per a moure el flagel.

Adicionalment, aquestes molècules contribueixen a crear un medi adient per a l'establiment d'altres microorganismes que conformen un altre element d'interès: la microbiota seminal.

### **1.3. La microbiota**

Tots els organismes vius complexos es troben colonitzats per comunitats de microorganismes, entre els que destaquen per abundància els bacteris. En els éssers humans hi estan presents pràcticament a tot el cos. S'estima que el número de bacteris que té un home adult estàndard és de 38 bilions, un 30% més que de cèl·lules humanes (Figura 3). S'han descrit grans colònies a la pell, el teixit conjuntiu o els genitals però sens dubte el col·lectiu més nombrós es troba en el tracte gastrointestinal. Aquest inclou la placa dental, la saliva, l'estómac i els intestins, en especial el còlon, on es troben més del 90% dels microorganismes (Sender *et al.*, 2016). Aquests nínxols ecològics són molt

**CAIXA DE CONCEPTES 1: Microbiota**

**Microbiota:** conjunt de microorganismes presents en un ambient determinat.

**Microbioma:** hàbitat que inclou la microbiota, els seus gens i les condicions ambientals que els envolten.

**Taxó:** grup d'organismes filogenèticament emparentats. Formen part d'una classificació jerarquitzada de menys a més similitud genètica.

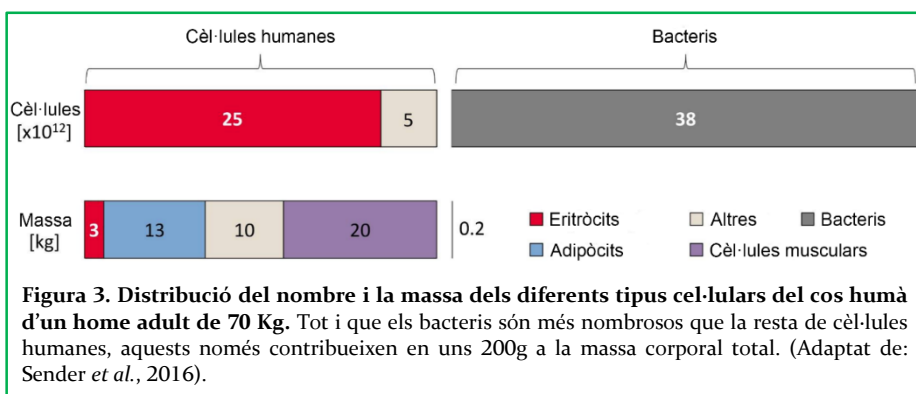
Domini – Regne – Filum – Classe – Ordre – Família – Gènere – Espècie

**OTU:** unitat taxonòmica operacional. Agrupació de microorganismes amb similituds genètiques en un marcador genètic segons un valor llinar (97%, 99%, etc.). Freqüentment representen un taxó bacterià específic.

**Composició taxonòmica:** abundàncies relatives dels diferents microorganismes de la microbiota.

diferents entre ells i creen comunitats de diferent composició, definint-se el conjunt de microorganismes dins d'un ambient determinat com a microbiota (Marchesi i Ravel, 2015).

La microbiota humana té una gran rellevància en el bon funcionament de l'organisme (Altveš *et al.*, 2020). Contribueix a l'aprenentatge i regulació del sistema immune (Gensollen *et al.*, 2016; Belkaid i Harrison, 2017), a la digestió dels aliments (Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2019), la producció de vitamines com la B12 o la K (LeBlanc *et al.*, 2011; Ellis *et al.*, 2021), el metabolisme de materials xenobiòtics (Clarke *et al.*, 2019; Nogacka *et al.*, 2019), i a la regulació de la pressió sanguínia (Marques *et al.*, 2018), entre



molts altres processos. De fet, la seva actuació no només és en efecte sinó també en defecte ja que diversos estudis mostren com una desregulació de la microbiota normal contribueix a malalties autoimmunes com diabetis tipus I (Gülden *et al.*, 2015), reumatisme, distròfia muscular, càncer (Rea *et al.*, 2018), problemes de coagulació sanguínia (Araki i Shirahata, 2020), o inclús a malalties neurològiques com depressió, autisme o Alzheimer (Fung *et al.*, 2017).

Tant es així que l'any 2008, l'Institut Nacional de Salut dels Estats Units (NIH) va promoure el Projecte del Microbioma Humà (HMP) amb l'objectiu d'identificar i caracteritzar els microorganismes que es troben associats a humans (Petersón *et al.*, 2009). Aquest projecte ha permès la publicació d'una base de dades de referència i ha aportat nova informació, com per exemple el fet que la microbiota aporta més gens responsables de la supervivència humana que el propi genoma humà, que les activitats metabòliques tenen una major importància en l'efecte sobre el cos humà que les espècies que hi estan implicades o que la composició de la microbiota és dinàmica i varia en el temps (Human Microbiome Project Consortium, 2012a, 2012b).

### **1.3.1. Microbiota en el tracte reproductiu femení**

Donada la implicació de la microbiota en la homeòstasi del cos, recentment s'ha incrementat l'interès en estudiar l'impacte de la microbiota genital en la fertilitat. Tot i que inicialment es creia que els tractes reproductors eren òrgans immuno-protegits i primordialment estèrils amb l'excepció de la vagina femenina, els avanços en tecnologies més sensibles com la seqüenciació de nova generació (NGS) han permès descobrir la presència de microorganismes a les superfícies i fluids dels genitals interns. Precisament perquè el tracte vaginal és més accessible i ric en microbiota, els estudis sobre la microbiota genital s'han centrat principalment en la dona.

Segons els estudis realitzats al HMP (Human Microbiome Project Consortium, 2012a, 2012b), la microbiota vaginal representa aproximadament el 9% de tota la microbiota femenina. S'hi han identificat més de 250 espècies entre les quals hi destaca en abundància un gènere en especial, *Lactobacillus* (Fettweis *et al.*, 2012; Gajer *et al.*, 2012). Altres generes com *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Atopobium* o *Anaerococcus* també s'han observat en menor quantitat. En conjunt, el tracte vaginal té una baixa diversitat alfa (intrapersonal) i relativament baixa diversitat beta (interpersonal) a nivell de gènere (Human Microbiome Project Consortium, 2012b). Tot i que la microbiota genital femenina mostra variacions dinàmiques durant el cicle menstrual, influenciat també per circumstàncies externes com el comportament sexual, la composició sembla tenir un balanç estable (Gajer *et al.*, 2012).

Les condicions ambientals vaginals afavoreixen el manteniment de les colònies de *Lactobacillus* a diversos nivells. Per exemple, la producció d'estrògens i progesterona promouen la secreció de glicogen a la paret vaginal. Els *Lactobacillus* i altres bacteris metabolitzen aquest glicogen en energia pròpia i àcid làctic, el qual és excretat a la vagina. L'àcid làctic manté el pH vaginal a 3.8 – 4.4 i no permet la proliferació de bacteris oportunistes (Mendling, 2016). També produeixen bacteriocines, biosurfactants i altres molècules que inhibeixen l'adhesió de patògens (Reid, 2001).

Pel que fa a l'impacte de la microbiota genital femenina sobre la fertilitat, la informació actual és encara difusa i contradictòria. Hi ha evidències de la seva implicació en la formació dels gàmetes, la fecundació, la implantació i manteniment del fetus i la colonització dels òrgans del nou-nat (Moreno i Simon, 2019).

Diferents estudis han observat microbiotes diferents en dones infèrtils respecte de dones fèrtils, tant del tracte superior (ovaris, trompes de Fal·lopi i úter) com del inferior (cèrvix i vagina). Campisciano i col·laboradors van

trobar agrupacions bacterianes significatives, major diversitat i taxons específics de les dones infèrtils idiopàtiques (Campisciano *et al.*, 2017) mentre el laboratori de Wee va descriure *Ureaplasma* i *Gardnerella* amb més abundància a la vagina i cèrvix respectivament en dones infèrtils (Wee *et al.*, 2018). Altres autors destaquen la rellevància de *Lactobacillus* com a protector d'infeccions tot i no trobar cap relació directa amb la infertilitat, mentre descriuen tendències negatives poc o no significatives en gèneres com *Gardnerella*, *Ureaplasma*, *Atopobium*, *Veillonella* i *Staphylococcus* (Graspeuntner *et al.*, 2018; Koedooder *et al.*, 2019). No obstant, altres autors no han trobat correlacions entre els perfils bacterians trobats i la fertilitat (Kitaya *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2020). La baixa biomassa i el baix número mostral dels estudis poden ser la causa de les aparents contradiccions (Brandão i Gonçalves-Henriques, 2020; Tomaiuolo *et al.*, 2020b).

Per una altra banda, també s'ha observat una tendència negativa de la disbiòsi vaginal sobre l'èxit de les tècniques de reproducció assistida però les evidències són encara escasses (Moreno i Simon, 2019; Brandão i Gonçalves-Henriques, 2020; Tomaiuolo *et al.*, 2020b; Skafte-Holm *et al.*, 2021).

### **1.3.2. Microbiota en el tracte reproductiu masculí**

En contrapartida, l'estudi de la microbiota al tracte masculí és encara molt incipient. L'obtenció de mostres microbianes en regions anatòmiques internes del tracte genital masculí és difícil i presenta un alt risc de contaminació. Per aquest motiu, els estudis es centren principalment sobre el líquid seminal per la facilitat d'obtenció de mostres i l'impacte que té sobre els gàmetes masculins.

Les primeres aproximacions daten de la segona meitat del segle XX, on els estudis bacterians estaven basats en cultius en placa i fomentats per l'interès en les infeccions. Un exemple és l'estudi de l'equip de Rehewy on es van cultivar mostres seminals d'homes fèrtils i infèrtils en condicions aeròbiques i anaeròbiques. Aquests cultius mostraren un major nombre de bacteris



viables en el grup d'individus infèrtils, suggerint una major variabilitat en aquests, i la presència de gèneres bacterians com *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Mycoplasma* i *Ureaplasma* en el grup fèrtil (Rehewy *et al.*, 1979; Naessens *et al.*, 1986; Balmelli *et al.*, 1994). Més recentment s'han corroborat els resultats amb cultius més moderns on s'han aïllat principalment bacteris aerotolerants com *Staphylococcus* i *Corynebacteria* i bacteris d'àcid làctic com *Lactobacillus* i *Streptococcus* (Ivanov *et al.*, 2009). Malauradament, els estudis basats en cultius presenten moltes limitacions, ja que no totes les espècies poden créixer en una placa de cultiu i les condicions controlables sempre afavoreixen més un tipus de bacteris que uns altres, esbiaixant així el resultat.

Amb l'evolució de la tecnologia, alguns autors van optar per canviar l'estratègia d'anàlisi incorporant la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR), una tècnica que permet amplificar el material genètic i quantificar-lo simultàniament. Aquests estudis determinaren la presència majoritària d'*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacteria*, *Lactobacillus* i altres bacteris anaeròbics gram-positives (Jarvi *et al.*, 1996; Kiessling *et al.*, 2008). En general, els resultats obtinguts per ambdues aproximacions suggerien que la majoria de bacteris detectats en semen no eren bacteris comensals, sinó residus d'infeccions prèvies (Jarvi *et al.*, 1996; Kermes *et al.*, 2003; Kiessling *et al.*, 2008; Mändar, 2013; Altmäe *et al.*, 2019).

L'aparició de les tècniques de seqüenciació d'alt rendiment o NGS van obrir una nova etapa en l'estudi de la microbiota. La seva capacitat de seqüenciar grans quantitats d'ADN de forma massiva va permetre aprofundir en la identificació de noves espècies i conèixer més al detall les abundàncies relatives gràcies a la comparació de seqüència del gen *16S* ribosomal. L'any 2013 es va publicar el primer article sobre la microbiota seminal que utilitzava la piroseqüenciació de Roche 454 per a la identificació bacteriana. En aquest primer estudi, es va observar una gran variabilitat bacteriana entre diferents individus i es van descriure sis grups microbians, entre els que

destacaven per abundància dos grups amb predominança dels gèneres *Lactobacillus* i *Prevotella*, respectivament (Hou *et al.*, 2013).

En un estudi posterior, Weng i col·laboradors analitzaren el microbioma seminal utilitzant la plataforma de seqüenciació d'Illumina, més consolidada en l'anàlisi de microbiota (Weng *et al.*, 2014). Segons els resultats obtinguts, es van reduir els perfils bacterians a tres, depenent del gènere bacterià predominant: *Lactobacillus*-dominant, *Pseudomonas*-dominant i *Prevotella*-dominant, dels quals *Lactobacillus*-dominant va ser el perfil més abundant. Aquests resultats semblen confirmar-se en articles més recents també desenvolupats amb la plataforma d'Illumina (Baud *et al.*, 2019).

Altres autors han destacat *Lactobacillus* com a gènere més abundant en la comunitat seminal (Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). No obstant, un estudi publicat per Monteiro i col·laboradors presenta resultats contradictoris, amb una baixa abundància relativa d'aquest gènere en els individus analitzats, malgrat observar una major proporció de *Lactobacillus* en homes sans respecte a homes infèrtils (Monteiro *et al.*, 2018). Les diferències amb els estudis anteriors podrien ser degudes a la metodologia emprada, ja que l'estudi de Monteiro i col·laboradors ha estat l'únic en utilitzar la plataforma de seqüenciació Ion Torrent PGM i la regió hipervariable V3-V6 (Figura 7) del gen *16S* ribosomal (Taula 1).

Fins al moment, i segons el nostre coneixement, s'han publicat nou articles sobre microbiota seminal humana (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021) i les conclusions extretes han estat recollides per algunes revisions i meta-anàlisis (Altmäe *et al.*, 2019; Koedooder *et al.*, 2019; Lundy *et al.*, 2020; Tomaiuolo *et al.*, 2020a; Farahani *et al.*, 2021).

**Taula 1. Metodologies emprades en la caracterització de la microbiota seminal.** Descripció de les regions hipervariables del gen *16S* amplificades i la plataforma de seqüenciació utilitzada en cada cas.

Estudi	Regió 16S amplificada	Plataforma de seqüenciació
Hou <i>et al.</i> , 2013	V1-V2	Piroseqüenciació de Roche 454
Weng <i>et al.</i> , 2014	V4	Illumina Miseq
Mändar <i>et al.</i> , 2017	V6	Illumina HiSeq2000
Monteiro <i>et al.</i> , 2018	V3-V6	Ion Torrent PGM 316
Chen <i>et al.</i> , 2018	V4	Illumina HiSeq 2000
Baud <i>et al.</i> , 2019	V1-V2	Illumina MiSeq
Amato <i>et al.</i> , 2020	V3-V4	Illumina MiSeq
Yang <i>et al.</i> , 2020	V1-V2	Illumina HiSeq 2500
Lundy <i>et al.</i> , 2021	V3-V4	Illumina MiSeq
	<i>Shotgun</i>	Illumina NovaSeq 6000

En conjunt, aquests estudis semblen descartar la hipòtesi anterior de que el tracte genital masculí és estèril i no conté bacteris comensals, suggerint la presència d'una microbiota seminal composta pels filums *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021) on els deu gèneres més comuns són *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* i *Pelomonas* (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Amato *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). Tot i així, tots els autors posen de manifest una gran variabilitat interindividual que indicaria que cada home té una comunitat bacteriana pròpia.

### 1.3.3. Efecte de la microbiota seminal en la fertilitat

Tot i l'aparent consens en la composició bacteriana, la relació de la microbiota seminal amb la fertilitat masculina encara és tema de debat. En línia amb els estudis sobre el tracte femení, alguns autors detecten una major diversitat d'espècies en homes infèrtils (Rehewy *et al.*, 1979; Mändar *et al.*, 2017; Amato *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021) però d'altres no troben cap diferència en la diversitat bacteriana entre infèrtils i controls (Jarvi *et al.*, 1996; Weng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020).

Els estudis basats en cultius o PCR no van observar diferències de presència o abundància diferencial entre els grups clínics estudiats ni cap correlació amb els paràmetres seminals (Jarvi *et al.*, 1996; Willén *et al.*, 1996). D'igual manera, l'estudi de Hou i col·laboradors amb seqüenciació massiva tampoc va trobar relació entre els paràmetres seminals i els perfils bacterians observats (Hou *et al.*, 2013).

El gènere *Lactobacillus* és el més controvertit. Hi ha estudis que descriuen una disminució d'aquest taxó en homes infèrtils, relacionat directament amb una disminució de la qualitat seminal, especialment en la motilitat i viscositat (Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019). De fet, s'ha descrit el paper de *Lactobacillus* en la prevenció de la peroxidació lipídica espermàtica, a través de la producció d'àcids grassos de cadena curta (SCFA), suggerint un efecte probiòtic en el manteniment de la qualitat seminal i la salut humana (Barbonetti *et al.*, 2011; Markowiak-Kopeć i Ślizewska, 2020). D'altres estudis, però, destaquen un increment de *Lactobacillus*, juntament amb altres *Firmicutes* com *Ureaplasma*, *Finegoldia* i *Anaerococcus*, en astenozoospermics o azoospermics (Hou *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020) i suggereixen que una sobreproducció de SCFA podria disminuir el pH seminal, com ocorre en la vaginosi citolítica (Suresh *et al.*, 2009). Tant *Firmicutes* com *Staphylococcus* també s'han observat incrementats en individus control amb nivells de motilitat

espermàtica elevats (Baud *et al.*, 2019), mentre *Aerococcus* s'ha descrit inversament relacionat amb leucocitospèrnia i hiperviscositat (Lundy *et al.*, 2021).

Alguns gèneres bacterians dins el filum *Bacteroidetes* han estat directament relacionats amb una mala qualitat espermàtica. *Prevotella* sembla tenir una relació negativa amb la motilitat espermàtica i altres paràmetres seminals (Weng *et al.*, 2014; Baud *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021). La disminució de la motilitat espermàtica també s'ha vist correlacionada amb un increment de *Bacteroides* (Yang *et al.*, 2020), potser lligada a observacions prèvies de Balmelli on va associar *Bacteroides ureolyticus* amb un increment de la presència d'espermatozoides amb cua curta i una menor concentració de fructosa seminal, deixant menys suport energètic al gàmeta. *Bacteroides* i *Peptinophilus* també s'han trobat incrementats en pacients amb varicocele (Lundy *et al.*, 2021) i diversos *Bacteroidetes* en homes azoospèrmics (Chen *et al.*, 2018).

*Proteobacteries* com *Neisseria*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas* han estat directament relacionades amb hiperviscositat seminal i oligoastenoteratozoospèrnia (Weng *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020), encara que Lundy descriu una relació positiva entre *Pseudomonas* i la motilitat espermàtica (Lundy *et al.*, 2021). En Chen, va trobar el filum disminuït en azoospèrmics, juntament amb *Actinobacteries* (Chen *et al.*, 2018).

Els mecanismes moleculars pels quals els bacteris podrien alterar la qualitat seminal o la capacitat fèrtil són encara poc compresos. És conegut que els bacteris gram-negatius (principals incrementats en pacients astenozoospèrmics i oligoastenozoospèrmics) presenten lipopolisacàrids (LPS) en les seves parets bacterianes, molècules que indueixen la secreció de citocines inflamatòries (Yang *et al.*, 2020). S'han descrit diferències entre individus fèrtils i infèrtils en el cicle de S-adenosyl-L-methionine (SAM) (Lundy *et al.*, 2021). L'increment de certs tipus de metabolismes bacterians

també podrien incrementar la concentració de ROS, tot i que en Lundy troba diferències modestes entre individus amb baix i alt potencial oxidant-reductor (ORP) (Lundy *et al.*, 2021). Fins i tot s'han descrit mecanismes pels quals els bacteris podrien ser capaços d'interaccionar directament amb els espermatozoides per adhesió o secretant factors que afecten la motilitat espermàtica o promouen l'apoptosi cel·lular (Du Plessis *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2018).

En resum, l'actual coneixement del paper de la microbiota seminal en la fertilitat es troba en una etapa molt inicial però es suggereixen associacions interessants amb alguns paràmetres seminals i espermàtics (Taula 2), fet que fa necessari fer estudis addicionals per ampliar el coneixement d'aquest nou aspecte de la reproducció humana.

Taula 2. Principals associacions entre la microbiota i els paràmetres seminals i espermàtics.

	Associats a valors positius	Associats a valors negatius
<b>Motilitat</b>	<b>Firmicutes:</b> <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> <b>Proteobacteria:</b> <i>Pseudomonas</i>	<b>Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i>
<b>Recompte espermàtic</b>	<b>Actinobacteria</b>	<b>Bacteroidetes</b> <b>Firmicutes:</b> <i>Anaerococcus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Ureaplasma</i> <b>Proteobacteria:</b> <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i>
<b>Viscositat</b>	<b>Firmicutes:</b> <i>Aerococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	<b>Proteobacteria:</b> <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i>
<b>Leucocitospèrmia</b>	<b>Firmicutes:</b> <i>Aerococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	<b>Bacteroidetes:</b> <i>Prevotella</i>

#### 1.3.4. Infeccions i sistema immunitari

Quan una comunitat bacteriana comensal pateix un sobrecreixement o colonitza de manera massiva l'hàbitat, de manera que provoca danys i altera la homeòstasi fisiològica, es parla d'infeccions. Les infeccions del tracte genital masculí (MGTI) són una de les causes més freqüents de pèrdua de capacitat fèrtil amb una prevalença del 35-45% (Bayasgalan *et al.*, 2004; Henkel *et al.*, 2007) i estan causades principalment per patògens de transmissió sexual com *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*, *Escherichia coli* i *Neisseria gonorrhoea*. El creixement descontrolat d'aquests bacteris i el conseqüent reclutament de leucòcits pot afectar el funcionament normal del sistema reproductor a través de múltiples mecanismes com l'augment de la viscositat seminal (Wang *et al.*, 2006), les interaccions cel·lulars i aglutinacions (Ochsendorf, 1999; Kaur i Prabha, 2014; Valley *et al.*, 2018), la producció de ROS i citocines que indueixen apoptosi o alteracions de la integritat de l'ADN espermàtic (Eley *et al.*, 2005; Fraczek i Kurpisz, 2015; Valley *et al.*, 2018), o la disfunció física del tracte genital (Henkel *et al.*, 2021).

La presència de leucòcits en el tracte genital masculí o l'ejaculat és habitual i forma part del sistema d'immunovigilància, principalment present a l'epidídim per, per exemple, fagocitar espermatozoides alterats. Ara bé, quan els nivells de leucòcits seminals excedeixen els nivells basals per la presència d'infeccions o altres anomalies, amb concentracions seminals per sobre d'un milió de leucòcits per mil·lilitre (World Health Organization, 2010), l'efecte passa a ser negatiu per a la fertilitat i es parla de leucocitospèrmia. Els leucòcits contribueixen a la producció de ROS mitjançant la secreció de citocines inflamatòries com IL-6, IL-8 o interferó- $\gamma$ , les quals també poden inhibir directament la motilitat espermàtica (Fedder i Ellerman-Eriksen, 1995). De fet, els nivells de citocines en pacients amb astenozoospèrmia poden ser fins a un 60% superiors als dels controls fèrtils sans (Chyra-Jach *et*

*al.*, 2018). L'increment de l'estrès oxidatiu produeix, com veurem més endavant, dany a l'ADN espermàtic, peroxidació lipídica de la membrana cel·lular o deteriorament de l'activitat mitocondrial. En casos menys freqüents, els leucòcits també poden produir anticossos contra els espermatozoides produint fallades testiculars o infeccions cròniques (Francavilla *et al.*, 2007; Vickram *et al.*, 2019).

Finalment, no només les infeccions bacterianes provoquen problemes de fertilitat. Alguns virus també tenen aquest efecte, com per exemple el virus del papil·loma humà, el de l'hepatitis B, l'herpes símplex o l'Epstein-Barr.

#### **1.4. Marcadors d'infertilitat masculina**

L'estudi de l'etiologia d'una malaltia cel·lular o molecular presenta importants dificultats per la impossibilitat d'observar directament les afeccions derivades, fent necessari l'ús d'unes eines clau en la medicina: els biomarcadors.

Un biomarcador és una característica que es pot mesurar de forma objectiva i que serveix com a indicador d'un estat o procés biològic o d'una resposta a una exposició o intervenció determinada. Com més relacionat estigui el biomarcador amb els mecanismes biològics de la malaltia, més precís serà a l'hora d'explicar-los i més rellevància clínica tindran. Així, no només és important trobar biomarcadors, sinó que aquests siguin sensibles i específics.

Actualment, els biomarcadors més utilitzats per a diagnosticar la pèrdua de fertilitat masculina s'obtenen a partir d'una anàlisi bàsica de la mostra de semen anomenada seminograma. Aquesta anàlisi té una capacitat diagnòstica limitada perquè aproximadament en el 15% dels casos no aconsegueix trobar l'origen del problema. Per aquest motiu, en les últimes dècades s'han explorat noves aproximacions per trobar nous biomarcadors que aportin un poder diagnòstic més elevat. Aconseguir identificar l'origen dels casos idiopàtics permetrà millorar el diagnòstic i utilitzar tractaments més dirigits i específics.



### 1.4.1. El seminograma

El seminograma, també conegut com espermiograma o espermograma, és una prova diagnòstica que té com a objectiu avaluar la qualitat del semen. S'analitzen tant de manera qualitativa com quantitativa un seguit de biomarcadors macroscòpics i microscòpics del líquid seminal que s'han demostrat capaços d'explicar algunes de les causes més freqüents d'infertilitat masculina. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) ha publicat un manual indicant els valors de referència per aquests paràmetres amb el suport de múltiples publicacions científiques que avalen el seu potencial diagnòstic. La cinquena edició d'aquest manual data de l'any 2010 (World Health Organization, 2010) i és la utilitzada en l'última dècada. Darrerament, a finals de juliol d'aquest any, s'ha publicat la sisena edició (World Health Organization, 2021). A continuació es descriuen els valors de classificació de la cinquena edició, versió utilitzada en aquesta tesi.

L'anàlisi seminal habitualment comença amb una inspecció macroscòpica després de la liqüefacció total de la mostra. Es mesuren diversos paràmetres com el volum, el pH, la viscositat, el color i l'aspecte. El volum seminal, a més de ser un valor necessari per a calcular altres paràmetres posteriors, informa de possibles obstruccions o ejaculacions retrògrades en cas de volums per sota de 1,5 ml. El pH seminal reflecteix el balanç d'acidesa entre les diferents secrecions de les glàndules accessòries, on principalment les secrecions alcalines provenen de les vesícules seminals i les secrecions àcides de la pròstata. Mostres amb valors per sota de 7.2 es consideren anòmales. La viscositat del plasma seminal és un paràmetre important que interfereix directament en altres capacitats fèrtils, dificultant per exemple la motilitat espermàtica en casos d'alta viscositat (Du Plessis *et al.*, 2013; Flint *et al.*, 2014). També és un indicador de la presència d'infeccions bacterianes i s'ha relacionat amb altres alteracions com el dany oxidatiu i la leucocitospèrmia (Aydemir *et al.*, 2008; Flint, 2012; Flint *et al.*, 2014). Actualment no hi ha un

procediment estandarditzat per el seu càlcul, pel que habitualment es presenta en forma categòrica. Tot i així, alguns autors han proposat metodologies més acurades com l'ús de viscosímetres o l'anàlisi de la capacitat de filtració per capil·laritat (Lin *et al.*, 1992; Rijnders *et al.*, 2007).

Encara que l'anàlisi macroscòpica té importància, el veritable poder diagnòstic del seminograma es troba en els paràmetres microscòpics. El biomarcador més important d'infertilitat masculina és la motilitat espermàtica, àmpliament estudiada i relacionada amb les taxes d'embaràs (Lewis, 2007; Kumar i Singh, 2015; Fainberg i Kashanian, 2019). Segons les últimes recomanacions de la OMS, els espermatozoides es poden classificar en tres graus de mobilitat:

- Motilitat progressiva: espermatozoides que es mouen activament de forma lineal o parcialment lineal. Presentar menys del 32% de gàmetes amb motilitat progressiva pot incidir en la capacitat fèrtil de l'individu.
- Motilitat no progressiva: espermatozoides amb patrons de motilitat amb absència de progressió (moviment en cercles, sense desplaçament, etc.).
- Immobilitat: espermatozoides sense moviment.

Els problemes de motilitat dificulten que els espermatozoides puguin arribar fins al gàmeta femení. De fet, aquesta és una de les principals causes d'infertilitat masculina i, possiblement, la més freqüent. Ara bé, en la majoria dels casos aquest problema només suposa una pèrdua parcial de la capacitat fèrtil, ja que no és necessari que tots els espermatozoides arribin fins a l'oòcit per a fecundar-lo. Així, es considera anòmal un número d'espermatozoides mòbils per sota del 40%.

Per una altra banda, la morfologia espermàtica també és un biomarcador utilitzat tradicionalment en el diagnòstic, però que en els últims anys s'ha posat en qüestió enfront altres paràmetres més informatius. Està descrit que

els homes subfèrtils tenen un percentatge de formes normals inferior als homes amb fertilitat provada (Guzick *et al.*, 2001) però encara està en debat si la forma té un impacte important en la funció del gàmet. La forma del cap i de la cua podrien influir en la motilitat o en la capacitat de penetració de la zona pel·lúcida de l'òocit, així com podrien evidenciar errors en la espermatogènesi o en el procés de maduració, però no en tots els casos (Danis i Samplaski, 2019). Per aquest motiu el manual de la OMS ha anat disminuint el llindar del percentatge de formes normals necessàries per considerar normozoospermia amb cada edició (80,5% 1<sup>a</sup> ed.; 50% 2<sup>a</sup> ed.; 30% 3<sup>a</sup> ed.; 14% 4<sup>a</sup> ed.; 4% 5<sup>a</sup> ed.) fins arribar als valors actuals, on es consideren nivells limítrofs entre el 4-13% i nivells patològics per sota de 4% de formes normals (World Health Organization, 2021). Aquest mateix manual té recollides les característiques que ha de complir un espermatozoide per ser considerat morfològicament normal, juntament amb exemples de formes anòmales habituals.

Finalment, un altre valor a destacar és la quantitat d'espermatozoides presents al semen. Es valora amb dos paràmetres: el nombre d'espermatozoides totals a la mostra i la concentració espermàtica. Aquests valors s'estimen fent un recompte en vàries cel·les de mida determinada i s'extrapola el resultat al volum total de la mostra. Segons la OMS es requereix un mínim de 39 milions d'espermatozoides per mostra i una concentració mínima de 15 milions/ml. A major quantitat de gàmetes més probabilitats hi ha de que siguin aptes per fecundar l'òocit.

El seminograma recull moltes característiques bàsiques que permeten fer un ràpid diagnòstic de la majoria dels casos. No obstant això, el 15-20% dels homes infèrtils presenten normozoospermia (tots els valors del seminograma per sobre del llindar de normalitat) i no s'arriba a conèixer la causa del problema. S'evidencia així la necessitat de millorar el poder diagnòstic amb nous biomarcadors que aportin llum als mecanismes biològics de la infertilitat masculina per entendre millor l'etiologia de la malaltia. I d'entre

tots els possibles candidats, la fragmentació de l'ADN espermàtic i l'estrès oxidatiu semblen els que aporten una informació més valuosa.

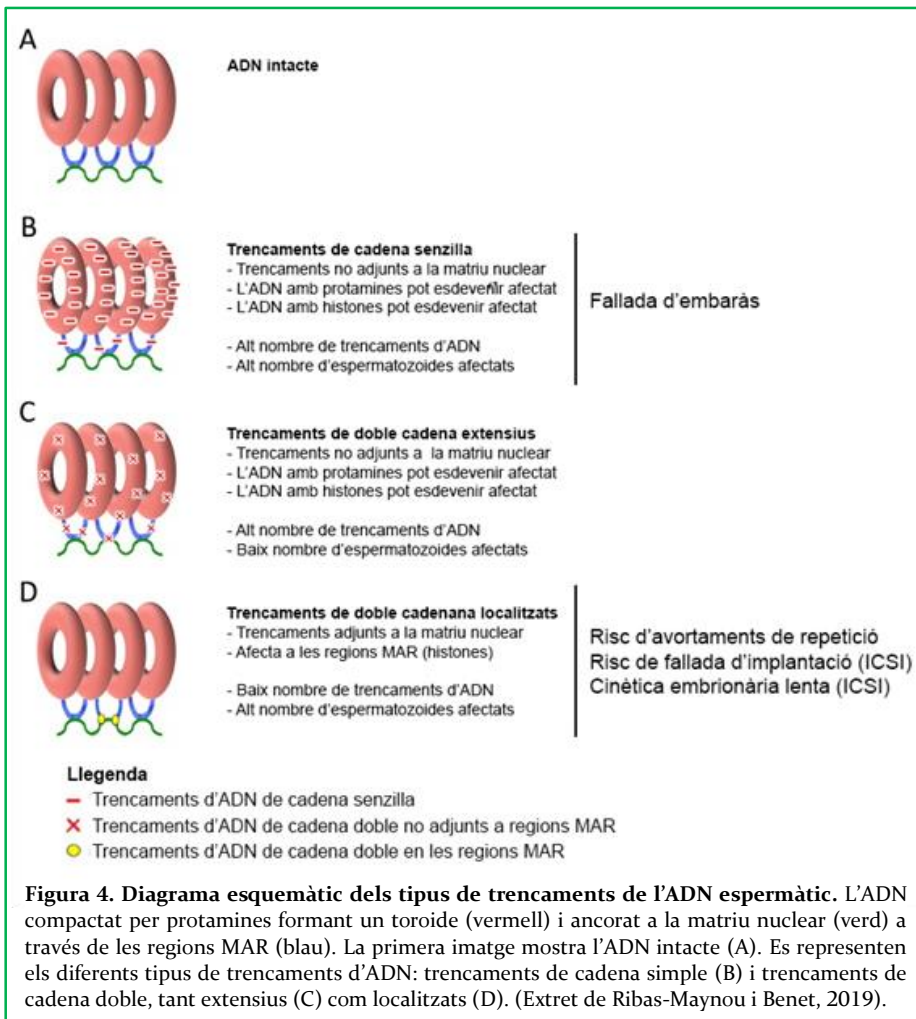
#### **1.4.2. Fragmentació de l'ADN espermàtic**

El terme fragmentació de l'ADN espermàtic comprèn un conjunt d'alteracions sobre la molècula, entre els que trobem els trencaments de cadena, les modificacions o alteracions químiques de bases nitrogenades, presència de llocs abàsics o fenòmens d'entrecruament entre ADN i proteïnes o entre dues molècules d'ADN (cross-links) (Barratt *et al.*, 2010). Qualsevol d'aquests fenòmens pot provocar un trencament de la molècula i, per aquest motiu, s'engloben dins aquest terme.

La integritat de l'ADN espermàtic és essencial per aconseguir una fecundació que esdevingui un nou individu. Els danys en la molècula d'ADN d'una cèl·lula poden induir des d'una transformació cel·lular fins a un procés d'apoptosi. En els gàmetes, a més, també pot afectar a la viabilitat del zigot amb un augment d'anomalies cromosòmiques o defectes congènits (Aitken i Krausz, 2001; Aitken i Sawyer, 2003). Diversos estudis han observat que la presència d'una gran quantitat d'espermatozoides amb l'ADN compromès afecta a la taxa de natalitat o a l'èxit de les tècniques de reproducció assistida (Esbert *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2011a; Nuñez-Calonge *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2012; Alkhayal *et al.*, 2013; Malić Vončina *et al.*, 2016; Esquerré-Lamare *et al.*, 2018). També s'han descrit correlacions entre la fragmentació d'ADN espermàtic i altres biomarcadors com la motilitat espermàtica (Evenson *et al.*, 2002; Lewis i Simon, 2010; Peluso *et al.*, 2013).

L'ADN és una molècula helicoidal formada per dues cadenes de nucleòtids unides per ponts d'hidrogen. Per la seva estructura podem distingir dos tipus de trencaments: el trencament d'una sola de les cadenes en un punt concret (trencament de cadena simple) o el trencament de les dues cadenes en el mateix punt (trencament de cadena doble). Els trencaments de cadena

simple els podem trobar en qualsevol punt de l'ADN i es produeixen principalment per danys químics com la oxidació. Quan aquests trencaments els trobem de forma extensiva, produeixen una disminució de les taxes d'embaràs (Saleh *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2011b, 2014; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a, 2013; Cho i Agarwal, 2018). Per contra, els trencaments de cadena doble es localitzen principalment a les regions MAR, encara unides a histones i amb una compactació més laxa; tot i que també es poden trobar de forma extensiva amb menys freqüència (Figura 4). Aquest tipus de trencament està més associat a activitats enzimàtiques o a errors de reparació i produeix alteracions més letals que condueixen a un augment del risc d'avortaments



de repetició, fallades d'implantació o pitjors cinètiques embrionàries (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a, 2013; Casanovas *et al.*, 2019; Ribas-Maynou i Benet, 2019).

Encara que els trencaments s'associen a un mal funcionament, durant l'espermatogènesi, a la profase I de la meiosi, els espermatòcits produeixen de forma deliberada trencaments de doble cadena al seu ADN per permetre la recombinació entre cromosomes homòlegs. Existeix, però, una maquinaria de reparació de l'ADN, inherent en tota cèl·lula, que permet tornar a unir els fragments i generar un intercanvi de material entre cromosomes.

La fragmentació de l'ADN espermàtic té un origen multifactorial on probablement diversos factors actuen de manera conjunta. Principalment destaquen fenòmens com l'estrès oxidatiu, l'apoptosi o alteracions de l'empaquetament de l'ADN, així com factors ambientals d'exposició a agents fisicoquímics o l'estil de vida.

#### **1.4.2.1. Estrès oxidatiu**

De les moltes vies d'investigació obertes a la recerca de nous biomarcadors d'infertilitat masculina, l'estrès oxidatiu és una de les més fructíferes i prometedores. En termes bioquímics, l'estrès oxidatiu és un augment significatiu de molècules altament reactives formades com a subproducte del metabolisme normal de l'oxigen, principalment anomenades espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquestes ROS són molècules habituals en els sistemes cel·lulars, els quals disposen de mecanismes reductors (o antioxidants) com el sistema glutatió reductasa/peroxidasa o la superòxid dismutasa, que mantenen un equilibri reductor-oxidant (redox) per evitar els efectes nocius que provoquen aquestes molècules reactives.

Al tracte reproductor masculí les ROS són produïdes principalment per leucòcits, bacteris i els propis espermatozoides com a productes de la respiració cel·lular i la producció de adenosina trifosfat (ATP) als mitocondris

com a font d'energia. En condicions normals, uns nivells basals de ROS són fonamentals per a activar la capacitació espermàtica i la reacció acrosòmica (de Lamirande i Gagnon, 1993; Aitken *et al.*, 1995; Marzec-Wróblewska *et al.*, 2012). Quan el metabolisme de l'oxigen no funciona correctament o els mecanismes antioxidants es troben afectats, els nivells de ROS augmenten i s'eleva el risc de que reaccionin químicament amb estructures cel·lulars. Les ROS poden produir trencaments de membrana citoplasmàtica o mitocondrial per peroxidació lipídica, alteració de la capacitació espermàtica, formació de productes mutagènics i, freqüentment, fragmentació de l'estructura de l'ADN (Agarwal *et al.*, 2017b; Aitken, 2017; Bisht *et al.*, 2017). L'estrès oxidatiu pot induir la pèrdua d'una base nitrogenada, fenòmens de cross-link o hidroxilacions de la guanina, danys principalment de cadena simple i que s'han relacionat directament amb la infertilitat masculina (De Iuliis *et al.*, 2009b; Aitken i De Iuliis, 2010). De fet, entre un 30 i un 80% dels homes infèrtils presenten estrès oxidatiu segons diferents estudis (Ochsendorf *et al.*, 1994; Shekarriz *et al.*, 1995; Koppers *et al.*, 2008; Aitken, 2017; Wagner *et al.*, 2018).

Existeixen diferents tècniques que permeten valorar l'estrès oxidatiu seminal, basades la majoria en la quantificació de ROS, ja sigui per mètodes quimioluminescents, colorimètrics o fluoroscòpis. Aquests mètodes, però, presenten diferents inconvenients que dificulten l'ús diari a clíniques de reproducció assistida i només tenen en compte els nivells de ROS a la mostra seminal (Agarwal *et al.*, 2019b). Recentment s'ha proposat una nova metodologia basada en un anàlisi electroquímic seminal que mesuri el potencial oxidant-reductor (ORP), el qual té en compte no només les ROS sinó també les molècules antioxidants presents al plasma seminal. És una mesura més directa de l'equilibri redox i, per tant, de l'estat global del medi espermàtic. L'anàlisi es realitza mitjançant el sistema MiOXSYS, el qual permet mesurar el ORP gràcies a un sensor galvanostàtic que detecta el flux d'electrons fruit de les reaccions redox que es donen al líquid seminal,

aportant com a resultat el voltatge del ORP estàtic (sORP) en milivolts (mV) (Agarwal *et al.*, 2016). El sORP s'ha correlacionat negativament amb diversos paràmetres seminals com la concentració, motilitat i morfologia espermàtiques (Roychoudhury *et al.*, 2016; Agarwal *et al.*, 2017a) i positivament amb la fragmentació de l'ADN espermàtic (Majzoub *et al.*, 2018; Homa *et al.*, 2019). El llindar de 1,34 mV/10<sup>6</sup> gàmetes/mL permet diferenciar el semen de qualitat anòmala amb un valor predictiu positiu del 94,7% (Agarwal *et al.*, 2016, 2017c, 2019a).

#### **1.4.2.2. Apoptosi i activació d'enzims hidrolítics**

L'apoptosi és un mecanisme de mort cel·lular programada present a totes les cèl·lules humanes. És regulada pel mateix organisme per controlar el seu desenvolupament i creixement. Aquesta via fa possible la destrucció de cèl·lules danyades impossibles de reparar i que podrien esdevenir cèl·lules canceroses o citotòxiques. Amb freqüència es produeixen processos apoptòtics en les cèl·lules germinals en cas que es detectin desequilibris durant l'espermatogènesi per evitar que aquests espermatozoides anòmals arribin a fecundar l'òcit.

Com a part d'aquest procés d'autodestrucció hi ha una activació d'enzims hidrolítics com caspases i nucleases que degraden proteïnes i material genètic respectivament. A més, aquestes cèl·lules que han de ser eliminades expressen a la seva membrana plasmàtica un marcador anomenat Fas que, en ser reconegut pel receptor FasL present a determinades cèl·lules del seu entorn (les cèl·lules de Sertoli en el cas de les cèl·lules germinals masculines), causen una fagocitosis de la cèl·lula apoptòtica. Si el sistema Fas/FasL presenta alguna anomalia o saturació, alguns espermatozoides apoptòtics no arribaran a ser fagocitats, el que es coneix com a apoptosi abortiva, arribant fins a l'epidídim a la espera de ser ejaculats. S'ha suggerit que aquests espermatozoides anòmals podrien activar per via intrínseca els enzims hidrolítics causant una degradació de les protamines i histones que



compacten l'ADN i una posterior fragmentació extensiva d'aquest ADN (Sakkas *et al.*, 1999a, 1999b).

Per una altra banda, l'espermatozoide podria presentar nucleases endògenes activades per altres motius o fins i tot adquirir nucleases exògenes que estiguin presents al plasma seminal (Nadano *et al.*, 1993; Maione *et al.*, 1997). Donat que, en aquest cas, l'ADN espermàtic mantindria el seu empaquetament, el dany es produiria principalment en les regions més sensibles, com les regions MAR (Ward, 2010), provocant principalment trencaments de cadena doble en localitzacions específiques.

#### **1.4.2.3. Alteracions de l'empaquetament de l'ADN espermàtic**

Com ja s'ha detallat anteriorment, durant l'espermiogènesi es remodela la cromatina espermàtica amb la substitució de les histones per protamines per tal d'aconseguir un millor empaquetament de l'ADN per protegir-lo. Aquesta remodelació requereix que es realitzin alguns talls de la cadena d'ADN per acció d'enzims topoisomereses de tipus II que immediatament són reparats per la maquinaria cel·lular. No obstant, un excés de l'activitat topoisomerasa o una mala reparació pot esdevenir en fragmentació d'ADN espermàtic (Bizzaro *et al.*, 2000).

Segons Aitken i De Iuliis, la fragmentació de l'ADN no es produiria per una única causa sinó com a resultat de diferents mecanismes que actuen a la mateixa vegada, formulant la hipòtesi dels dos passos (Aitken i De Iuliis, 2010). Errors durant la remodelació de la cromatina que resultin en una baixa taxa d'intercanvi per protamines o en una relació anòmala de les protamines 1 i 2 (ràtio P1/P2) deixaran l'ADN amb un menor grau de compactació (1er pas) i, per tant, més exposat a patir trencaments per altres vies com l'estrès oxidatiu (2on pas); d'aquesta manera augmentaria principalment el dany de cadena simple (Torregrosa *et al.*, 2006; Aitken i De Iuliis, 2010; García-Peiró *et al.*, 2011a; Ribas-Maynou *et al.*, 2020). Aquests

errors apareixen freqüentment en individus amb reorganitzacions cromosòmiques o varicocele (García-Peiró *et al.*, 2011b, 2012).

Per valorar el grau de compactació de l'ADN espermàtic existeixen diferents tècniques, algunes basades en detectar la ràtio P1/2 i d'altres en detectar la falta de protamines. Una d'elles és la tinció amb cromomicina A3 (CMA3), una molècula que competeix amb les protamines per unir-se al solc menor de l'ADN (De Iuliis *et al.*, 2009b). Una menor presència de protamines permetrà que les molècules de CMA3 marcades fluorescentment ocupin els espais buits i puguin ser posteriorment detectades per microscòpia de fluorescència.

#### **1.4.2.4. Exposició a agents fisicoquímics**

S'han aportat evidències de l'efecte d'alguns agents físics i productes químics sobre paràmetres espermàtics com la motilitat, concentració o fragmentació de l'ADN.

A l'àmbit laboral s'han detectat multitud de substàncies químiques amb efectes nocius per a la línia germinal. Productes com dissolvents, resines fenòliques i epoxi, fums de soldadures, metalls pensants o la gasolina poden produir mutacions a l'ADN de la línia germinal que poden passar a la descendència i augmentar la susceptibilitat a patir malalties tals com el càncer (Wilkins i Hundley, 1990; Colt i Blair, 1998). A menor nivell, l'ambient urbà acumula una gran quantitat de pol·lució a l'aire provinent de la indústria i el tràfic de vehicles que també s'ha demostrat que produeix una disminució de la concentració, motilitat, morfologia espermàtiques. Més concretament, contaminants com el diòxid de sofre (SO<sub>2</sub>) o hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH) com el pirè són els més associats negativament a gairebé tots els biomarcadors de fertilitat masculina i, tot i que el seu impacte aïllat pot ser baix, l'efecte acumulatiu de diversos contaminants en conjunt pot arribar a ser molt rellevant (Wang *et al.*, 2021).

En relació amb la fragmentació de l'ADN, diverses substàncies produeixen de forma directa modificacions a l'ADN o desequilibris redox que condueixen a trencaments del material genètic, com l'estirè o diversos insecticides o pesticides (Migliore *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2004; Sánchez-Peña *et al.*, 2004). Però és la exposició a contaminants de l'aire com SO<sub>2</sub> o benzo(ghi)perilè (PAH) el que està més estès a la població, amb un efecte directe sobre els nivells de dany a l'ADN (Wang *et al.*, 2021).

Cal destacar també els tractaments citotòxics com la quimioteràpia o la radioteràpia, els quals es coneix que produeixen un efecte deleteri en l'epiteli germinal dels túbuls seminífers (Centola *et al.*, 1994; Howell i Shalet, 2001), que amb freqüència deriva en una alta incidència d'azoospermia. Aquests tractaments també són altament mutagènics sobre tot en cèl·lules amb una alta taxa de replicació, com les cèl·lules germinals primordials. Si aquestes acumulen mutacions i no són eliminades o reparades, poden augmentar el nombre d'espermatozoides amb fragmentació a l'ADN o, fins i tot, augmentar la susceptibilitat a la carcinogènesi transgeneracional a la descendència (Chatterjee *et al.*, 2000; Hoyes *et al.*, 2001).

Independentment dels tractaments radioterapèutics que es caracteritzen per dosis molt altes de radiació, encara està en qüestió si les radiacions electromagnètiques de baixa freqüència, com les provinents dels telèfons mòbils o les senyals de radiofreqüència tenen un efecte sobre la fertilitat. Fins al moment, els estudis són contradictoris però semblen indicar que, tot i que si s'ha demostrat un increment de la fragmentació a l'ADN espermàtic sobre tot en estudis *in vitro* (De Iuliis *et al.*, 2009a), el dany és molt residual i els efectes no arriben a traduir-se en una disminució de la capacitat fèrtil (Aitken *et al.*, 2005; Houston *et al.*, 2016, 2018, 2019; Vereschako i Chueshova, 2017). No obstant, les radiacions electromagnètiques també són fonts de calor que si produeixen hipertèrmia escrotal poden afectar directament l'espermatogènesi, afavorint l'aparició de trencaments a l'ADN, com ocorre en pacients amb varicocele (Kang *et al.*, 2021).

#### 1.4.2.5. Estil de vida

L'estil de vida que porta una persona i els seus hàbits de consum tenen una forta influència en la seva salut i cal valorar-ho durant el diagnòstic de la infertilitat.

La dieta és un dels principals factors que afecten a la fertilitat. S'ha observat com la falta de certs micronutrients com la vitamina B, l'àcid fòlic o el cinc poden contribuir a empitjorar el potencial fèrtil (Anderson *et al.*, 2010). Ara bé, paràmetres com l'índex de massa corporal o la ingesta d'àcids grassos poliinsaturats tenen efectes directes sobre la motilitat, concentració i la fragmentació de l'ADN espermàtic; tot a través de mecanismes com la inducció de la producció de citocines pro-inflamatòries, alteracions dels perfils hormonals, hipertèrmia escrotal o l'augment de ROS per part dels adipòcits (Du Plessis *et al.*, 2010; Sepidarkish *et al.*, 2020).

El consum de estupefaents també té efectes perjudicials sobre la fertilitat masculina. El consum de tabac té un efecte clarament negatiu sobre el recompte d'espermatozoides i la seva motilitat i morfologia però també augmenta l'estrès oxidatiu i la fragmentació de l'ADN espermàtic (Taha *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014; Boeri *et al.*, 2019; De Brucker *et al.*, 2020). L'alcohol i la cafeïna també promouen l'aparició d'estrès oxidatiu i fragmentació d'ADN a la vegada que actuen sobre altres mecanismes que alteren la fertilitat (Anderson *et al.*, 2010; Boeri *et al.*, 2019). D'igual manera, el cànnabis i altres drogues com la heroïna produeixen efectes molt semblants (Bari *et al.*, 2011; Ajayi i Akhigbe, 2020; Nazmara *et al.*, 2021).

No només el consum de substàncies pot alterar el bon funcionament del sistema reproductor, malalties psicològiques com l'estrès, la depressió o l'ansietat també poden arribar a afectar, normalment amb canvis metabòlics o endocrins, als gàmetes masculins (Zorn *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2010; Nordkap *et al.*, 2020). Tot i així, no hi ha evidències clares sobre si

produeixen trencaments a l'ADN o només afecten a paràmetres com la motilitat o la morfologia.

Altres hàbits com la falta o abús de dormir, dutxar-se amb aigua calenta o utilitzar dispositius electrònics que generen calor a prop de l'escrot també podrien estar implicats en la generació de fragmentació d'ADN però els seus efectes són més residuals i no hi ha prou estudis que donin suport a aquesta hipòtesi (Anderson *et al.*, 2010).

### **1.4.3. Tècniques d'anàlisi de la fragmentació de l'ADN espermàtic**

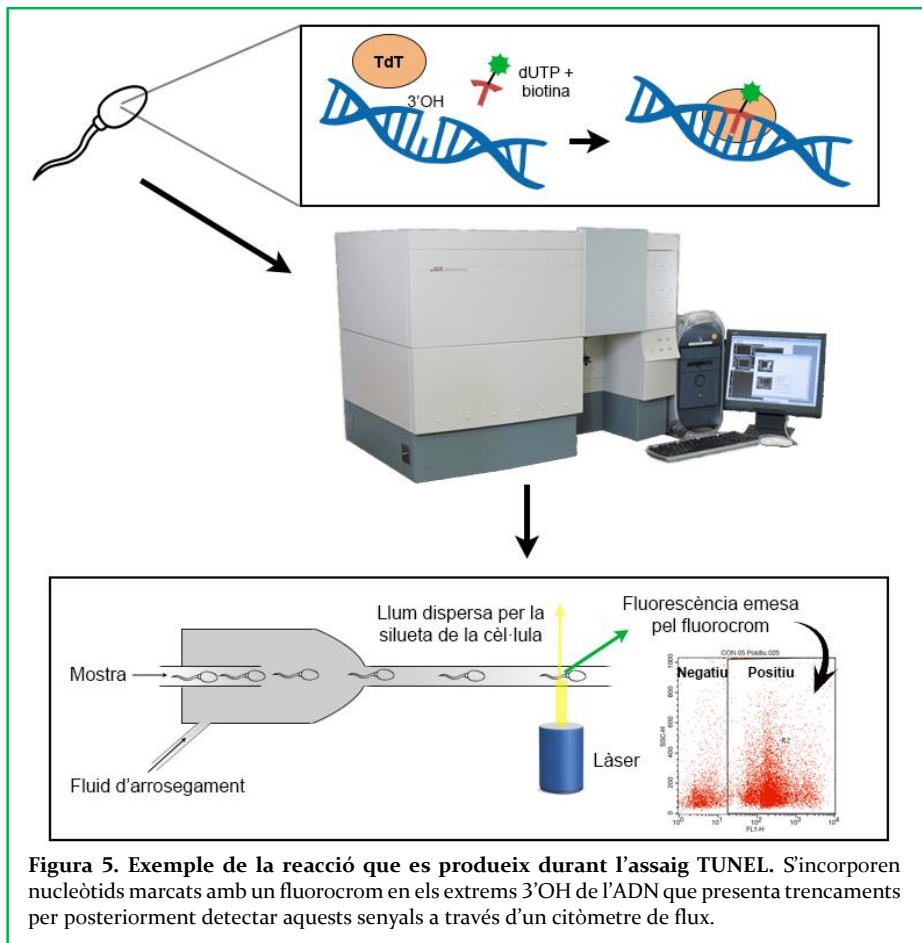
Existeixen diferents tècniques analítiques que permeten estudiar la quantitat de gàmetes amb l'ADN danyat. Les més utilitzades amb aquest fi són *Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)*, *Sperm Chromatin Dispersion test (SCD)*, Citometria de flux amb taronja d'acridina (AO FCM), l'assaig *Terminal transferase dUTP Nick-End Labelling (TUNEL)* i l'assaig Comet. Aquestes dues últimes permeten valorar de forma directa la presència de trencaments a l'ADN de cadena simple i/o doble i són les que presenten una sensibilitat i especificitat més elevada (Ribas-Maynou *et al.*, 2013; World Health Organization, 2021).

#### **1.4.3.1 Assaig Terminal transferase dUTP Nick-End Labelling (TUNEL)**

L'assaig TUNEL és un mètode de detecció de trencaments de la cadena d'ADN molt utilitzat en estudis de cèl·lules apoptòtiques, que va ser descrit per primer cop per Gorczyca al 1992 (Gorczyca *et al.*, 1992). Quan una cadena d'ADN es trenca o es talla, els extrems on s'ha produït el tall presenten uns radicals OH<sup>-</sup> lliures en la posició 3' dels nucleòtids (3'OH). Aprofitant l'enzim deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una polimerasa extreta dels limfòcits que catalitza l'addició d'un nucleòtid a l'extrem 3'OH d'una cadena d'ADN, la tècnica incorpora en aquests extrems trencats un nucleòtid deoxiuridina trifosfat (dUTP) conjugat amb un fluorocrom (Figura 5). D'aquesta manera, cada extrem fruit del trencament emetrà llum fluorescent

visible. Donat que el marcatge es produeix en tots els extrems 3'OH, la tècnica marca indistintament trencaments de cadena senzilla i trencaments de cadena doble (Sharma *et al.*, 2021).

Un cop marcats els extrems, la intensitat de fluorescència que emet la cèl·lula està directament relacionada amb la quantitat de trencaments presents a l'ADN. Per valorar-ho es pot fer servir un microscopi de fluorescència en una mostra fixada en portaobjectes, subjecte a biaixos de l'observador (Muratori *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2011), o utilitzar un citòmetre de flux (Figura 5), alternativa que augmenta la sensibilitat de la prova (Domínguez-Fandos *et al.*, 2007). Tant un sistema com l'altre els resultats obtinguts s'expressen en el percentatge d'espermatozoides amb fragmentació a l'ADN en el total de la



**Figura 5.** Exemple de la reacció que es produeix durant l'assaig TUNEL. S'incorporen nucleòtids marcats amb un fluorocrom en els extrems 3'OH de l'ADN que presenta trencaments per posteriorment detectar aquests senyals a través d'un citòmetre de flux.

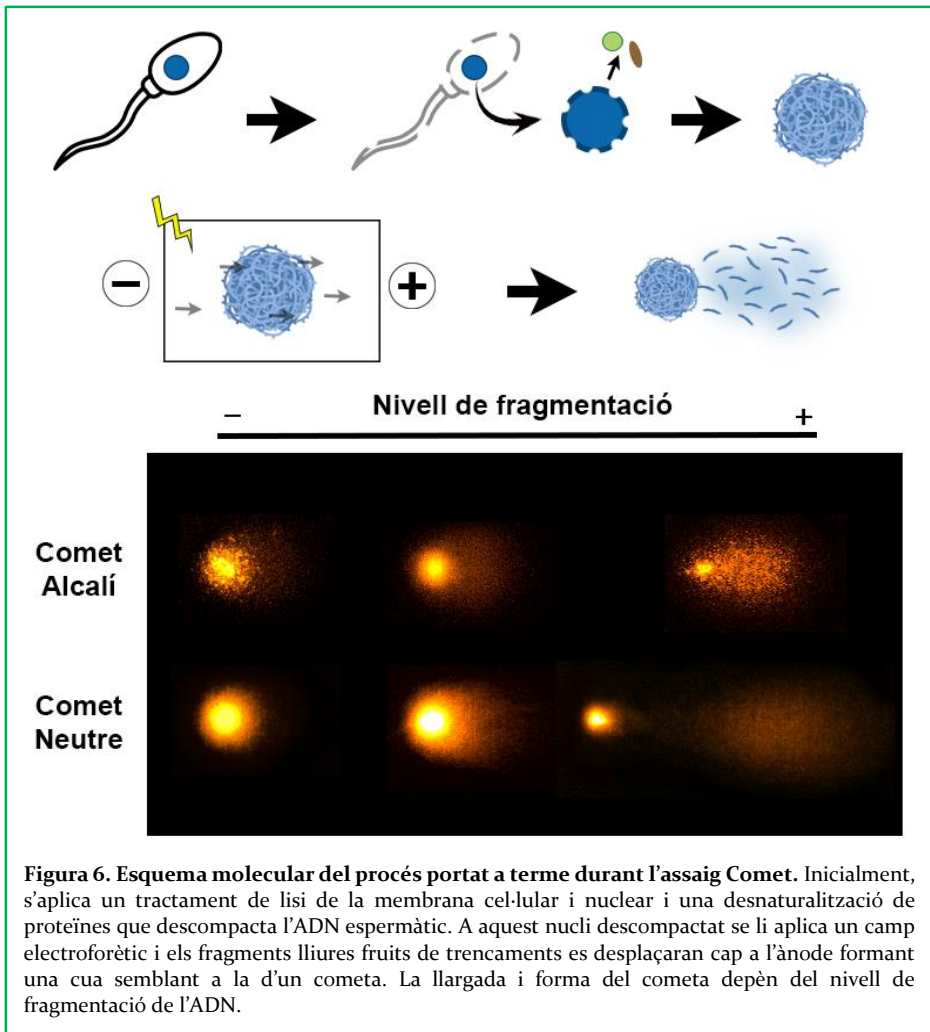
mostra i permeten distingir entre individus fèrtils i infèrtils (Lewis, 2007; Sharma *et al.*, 2010; García-Peiró *et al.*, 2012).

#### **1.4.3.2. Assaig Comet**

L'assaig d'electroforesis en gel en cèl·lula única (SCGE), comunament conegut com assaig Comet, és una tècnica descrita per Ostling i Johanson al 1984 creada principalment per estudis toxicològics i carcinogènics (Ostling i Johanson, 1984). No va ser fins al 1996 quan va ser adaptat per Hughes (Hughes *et al.*, 1996) per al seu ús en espermatozoides utilitzant la metodologia descrita per Singh (Singh *et al.*, 1988) i les modificacions de McKelvey-Martin (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Es tracta d'una tècnica no estandarditzada encara. Els diversos laboratoris que l'apliquen difereixen en el protocol a seguir, principalment en la composició de les solucions de lisi cel·lular i els temps d'electroforesi (Singh *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 2011b; Kumar *et al.*, 2013; Casanovas *et al.*, 2019). Per això, els resultats obtinguts en laboratoris diferents poden no ser completament comparables.

L'assaig Comet es basa en la descompactació de l'ADN nuclear mitjançant l'eliminació d'histones i protamines i una posterior electroforesi de cèl·lula única que permet la migració dels fragments d'ADN. Primerament, les cèl·lules són fixades en un portaobjectes amb una capa fina de gel d'agarosa. Allà, mitjançant solucions salines es lisen les cèl·lules i es desnaturalitzen les proteïnes per tal que l'ADN s'alliberi al medi i quedi descompactat. A continuació es realitza una electroforesi activant un camp elèctric que atrau l'ADN cap al pol positiu, aprofitant les càrregues iòniques negatives presents al material genètic. Els fragments d'ADN que estiguin lliures es separaran del nucli i migraran a través del gel generant una dispersió de material genètic que adopta l'aspecte d'una cua similar a l'estela d'un cometa, la llargada i intensitat de la qual estarà directament relacionada amb el grau de fragmentació que presenta aquesta cèl·lula (Figura 6).

Existeixen dues variants de l'assaig Comet segons les condicions en les que es realitzi l'electroforesi. Si s'utilitza un medi amb pH neutre l'ADN mantindrà la seva estructura de doble hèlix i la tècnica revelarà principalment trencaments de cadena doble, ja que si hi ha un trencament de cadena simple l'ADN encara es mantindrà unit per la cadena complementària i no migrarà cap a l'ànode. En canvi, si s'utilitza un medi amb pH alcalí l'ADN es desnatura i separant les dues cadenes, pel que els fragments derivats per trencaments de cadena doble o de cadena simple podrien migrar cap a l'ànode, formant la característica cua de cometa. Donat que els fragments fruit de trencaments de cadena doble són normalment més



**Figura 6.** Esquema molecular del procés portat a terme durant l'assaig Comet. Inicialment, s'aplica un tractament de lisi de la membrana cel·lular i nuclear i una desnatura i separació de proteïnes que descompacta l'ADN espermàtic. A aquest nucli descompactat se li aplica un camp electroforètic i els fragments lliures fruit de trencaments es desplaçaran cap a l'ànode formant una cua semblant a la d'un cometa. La llargada i forma del cometa depèn del nivell de fragmentació de l'ADN.



grans que els de cadena simple, si s'ajusta el temps d'electroforesi de manera que només tinguin temps de migrar els fragments curts, la tècnica revelarà principalment trencaments de cadena simple. Aquests resultats han estat validats induint els dos tipus de dany amb peròxid d'hidrogen per simular estrès oxidatiu que generi fragmentació de cadena simple i amb l'enzim endonucleasa Alu I que realitza talls de doble cadena en regions altament repetides de l'ADN (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

Per tal de fer visible l'ADN, generalment aquest es tenyeix amb DAPI. Així, l'observació dels resultats s'ha de realitzar amb un microscopi de fluorescència. El recompte d'espermatozoides està subjecte a biaix per part de l'observador pel que, recentment, s'han incorporat programes informàtics específics que realitzen mesures molt més precises de diferents paràmetres com la llargada de la cua del cometa, la intensitat de llum que emet (quantitat d'ADN fragmentat present a la cua), la relació entre la llargada de la cua i el diàmetre del cap, entre d'altres. Alguns d'aquests paràmetres s'han relacionat amb la fertilitat masculina, com l'*Olive Tail Moment* (OTM) (Garcia-Segura *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2017). Així, els resultats es poden expressar en percentatge d'espermatozoides amb fragmentació d'ADN o amb variables informàtiques quantitatives.

#### **1.4.4. Microbiota seminal**

Els estudis del microbioma han agafat força des de l'aparició de les tècniques de seqüenciació NGS que son capaces d'analitzar aquest tipus d'estudis complexos que inclouen una gran quantitat de dianes d'ADN. No obstant això, existeixen multitud de tècniques disponibles per analitzar la microbiota que aporten grans possibilitats en el camp però que dificulten la comparació entre estudis i la generació de consensos. La falta d'un protocol estandarditzat condueix a obtenir resultats diversos, sovint contradictoris, que deixen moltes incògnites. Portar a terme un estudi de la microbiota robust comporta prendre un seguit de consideracions importants per realitzar un bon disseny experimental.

#### **1.4.4.1. Consideracions experimentals d'un estudi de la microbiota**

El primer pas consisteix en seleccionar el tipus d'experiment a realitzar, com ara estudis cas-control o estudis longitudinals, els quals determinaran altres paràmetres com la mida mostral necessària o els temps de recollida de la mostra. En estudis cas-control, per exemple, existeix una gran variabilitat microbiana interindividual on l'estil de vida té una influència rellevant que cal tenir en compte (Engen *et al.*, 2015; Bibbò *et al.*, 2016; Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2019; Kolodziejczyk *et al.*, 2019; Redondo-Useros *et al.*, 2020; Gopinath *et al.*, 2021). Dades com la dieta, medicació, consum de tabac o alcohol, exposicions laborals, malalties i altres constitueixen el que s'anomena metadata, un seguit de factors que poden alterar la interpretació dels resultats i que cal documentar a l'hora de recollir les mostres.

A continuació s'ha d'establir un protocol de recollida de mostra que permeti obtenir el material d'estudi de manera íntegra i sigui totalment reproducible per a tots els individus. Cal definir uns bons criteris d'inclusió i exclusió per limitar l'efecte d'altres variables com la edat (Odamaki *et al.*, 2016; Zimmermann i Curtis, 2020) i seleccionar el tipus de controls necessaris per controlar aquestes variables i, en el cas d'estudis entre grups, que formin una mostra ben diferenciada dels casos a estudiar.

A partir d'aquest punt, cal escollir l'estratègia d'identificació dels microorganismes. Destaquen principalment tres aproximacions: la seqüenciació d'amplicó, la seqüenciació de genoma complet (*Whole genome sequencing*, WGS) o la metatranscriptòmica. L'estratègia basada en un amplicó es fonamenta en escollir una regió del genoma que tingui la capacitat de discernir entre taxons, com en el cas del gen *16S* ARNr. Es tracta d'un gen molt conservat en procariontes que conté algunes regions hipervariables diferents entre taxons i per això és el més utilitzat en aquest tipus d'estudis. Per una altra banda, la WGS es basa en la seqüenciació de tot l'ADN present a les mostres, de manera que s'obté molta més informació per discernir entre

els diferents taxons, però amb una quantitat de dades difícil de gestionar. Aquesta aproximació depèn de tècniques de seqüenciació massiva com la seqüenciació d'escopeta (*shotgun sequencing*) que consisteix en seqüenciar fragments aleatoris d'ADN per després fer una reconstrucció. Cada estratègia té avantatges i inconvenients que s'adeqüen al tipus d'estudi que es vol realitzar (Knight *et al.*, 2018), pel que cal escollir depenent del disseny experimental. En aquesta tesi s'ha seleccionat l'estratègia basada en l'amplicó 16S ARNr.

Diversos estudis han demostrat alteracions en la composició de la microbiota que depenen de diferents factors: de la recollida de mostra i el seu emmagatzematge (Domianni *et al.*, 2014; Jenkins *et al.*, 2018; Nel Van Zyl *et al.*, 2020), del protocol d'extracció seguit (Wesolowska-Andersen *et al.*, 2014; Wagner Mackenzie *et al.*, 2015; Sui *et al.*, 2020; Siebert *et al.*, 2021), dels encebadors (*primers*) escollits per a l'amplificació de l'ADN (Kuczynski *et al.*, 2011), de la plataforma de seqüenciació (Clooney *et al.*, 2016; Fouhy *et al.*, 2016; Allali *et al.*, 2017; Castelino *et al.*, 2017; Heikema *et al.*, 2020) o de la metodologia emprada durant l'anàlisi bioinformàtica (Schmidt *et al.*, 2015; Kopylova *et al.*, 2016; Allali *et al.*, 2017). Així, és important dissenyar un protocol i uns reactius iguals per a totes les mostres per evitar introduir biaixos que provinquin de les tècniques emprades.

Finalment, cal fer una menció especial a la contaminació bacteriana (Knight *et al.*, 2018; Pollock *et al.*, 2018). Un dels problemes més importants a l'hora de desenvolupar estudis de la microbiota és la contaminació bacteriana externa, particularment preocupant quan es treballa amb mostres de baixa biomassa microbiana. La presència de bacteris aliens a la mostra provoca la falsa identificació d'una comunitat microbiana que realment no existeix a la mostra i que pot alterar els resultats observats. La contaminació no ocorre només durant la recollida de la mostra sinó també durant la manipulació al laboratori, com ara al medi de criopreservació (Bajerski *et al.*, 2020) o a l'ambient de la cambra de treball. Sorprenentment, hi ha un tipus de

contaminació molt difícil d'evitar que és inherent als reactius utilitzats. Salter i col·laboradors van evidenciar que els kits d'extracció d'ADN o els reactius de PCR presenten comunitats bacterianes, les quals han rebut el nom de "kitoma". S'ha vist que el *kitoma* difereix entre diferents fabricants i també entre lots individuals (Salter *et al.*, 2014). Per aquest motiu, en el disseny experimental s'han d'introduir un seguit de controls negatius que permetin detectar la possible contaminació en cadascun dels passos del protocol per tenir en compte les possibles comunitats que poden alterar els resultats observats.

#### **1.4.4.2. Consideracions especials de les mostres seminals**

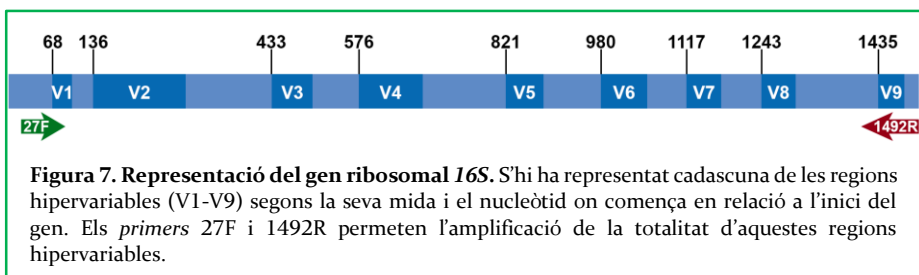
Adicionalment a les consideracions que s'han de tenir en compte en qualsevol estudi de la microbiota, les mostres seminals presenten unes peculiaritats especials amb implicacions sobre la metodologia. Donat que es tracta d'un fluid humà, la presència de cèl·lules humanes és inevitable i el seu ADN pot suposar un problema d'emascament de resultats o interferència amb els reactius de l'amplificació i seqüenciació. Espermatozoides, leucòcits i cèl·lules epitelials són les principals fonts d'ADN humà al semen. Així, el protocol d'extracció i purificació ha de comptar amb un mètode de sostracció o minimització del material genètic humà.

El nombre de bacteris presents al plasma seminal també és un punt rellevant a l'hora de dissenyar els procediments experimentals. Tal i com han observat en estudis anteriors, el líquid seminal presenta una baixa biomassa microbiana (Hou *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Lundy *et al.*, 2021). Això pot comportar una major dificultat en l'extracció de l'ADN, una possible pèrdua de bacteris amb poca representació, una menor profunditat de lectures de seqüenciació i un increment considerable de biaix degut a contaminació externa (Selway *et al.*, 2020). Per aquest motiu s'ha de posar a punt tot el protocol per trobar la configuració que optimitzi els resultats i mantenir un control estricte de la contaminació en tots els passos del mateix.

### 1.4.4.3. Mètodes de caracterització de la microbiota per seqüenciació d'amplicó

L'evolució de les tècniques d'anàlisi genètica ha normalitzat l'ús de l'ADN com a una empremta genètica bacteriana. La similitud de la seqüència d'ADN entre bacteris de la mateixa espècie és propera al 100%, mantenint grans semblances amb espècies filogenèticament properes i presentant més diferències com més allunyades estiguin evolutivament. Així, en l'actualitat disposem de diferents estratègies per identificar bacteris amb més o menys precisió i eficiència.

L'aproximació més comunament utilitzada per a l'anàlisi de la microbiota és l'amplificació de regions específiques d'un gen que permeti determinar la filogènia dels microorganismes presents en una mostra. Existeixen diversos gens que permeten aconseguir aquest objectiu però n'hi ha un que destaca per sobre de la resta. El gen ARN ribosomal *16S* (*16S* ARNr) és un gen únic dels procariontes que es troba en totes les espècies, freqüentment amb múltiples còpies en cada genoma bacterià. Es tracta d'un gen essencial que codifica per a la subunitat menor dels ribosomes bacterians, motiu pel qual té una seqüència molt conservada al llarg de la evolució. No obstant, presenta nou regions internes susceptibles a mutacions que han variat entre diferents taxons, les anomenades regions hipervariables (Figura 7). El fet que sigui un gen present a tots els bacteris i que disposi de seccions específiques per a cada espècie el fa un gen idoni per a la identificació taxonòmica.



**Figura 7. Representació del gen ribosomal 16S.** S'hi ha representat cadascuna de les regions hipervariables (V1-V9) segons la seva mida i el nucleòtid on comença en relació a l'inici del gen. Els primers 27F i 1492R permeten l'amplificació de la totalitat d'aquestes regions hipervariables.

L'elecció d'escollir només un gen enlloc de seqüenciar tot el genoma bacterià, el qual donaria una millor precisió en la identificació, té diversos avantatges que han fet d'aquesta l'estratègia més utilitzada (Ranjan *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2018):

- És l'estratègia més rendible econòmicament que dona resultats molt acurats en un temps raonable
- L'anàlisi de dades es troba estandarditzat amb múltiples protocols bioinformàtics àmpliament validats
- Existeixen bases de dades de referència molt completes que recullen gairebé totes les variacions del gen *16S* ARNr descrites per a cada espècie

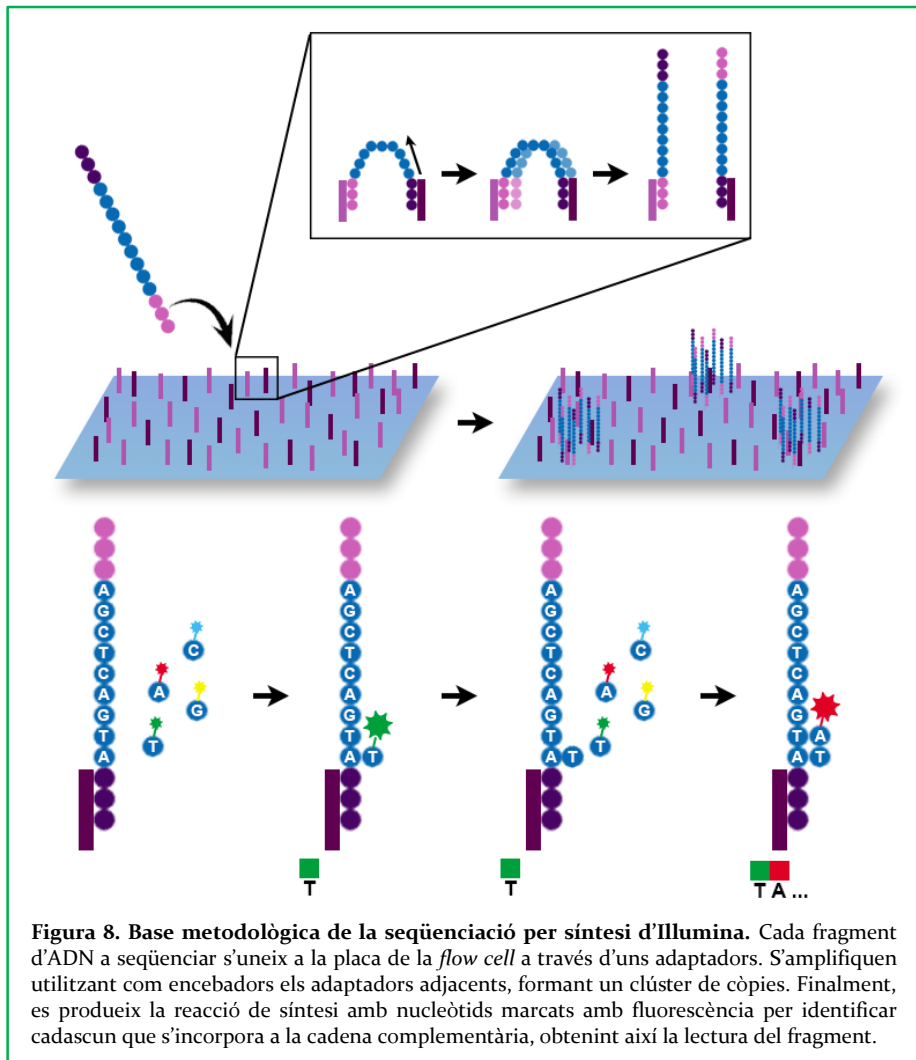
La tecnologia NGS ha permès durant dècades seqüenciar algunes d'aquestes regions hipervariables amb gran eficiència però la incorporació de les tecnologies de seqüenciació de tercera generació (TGS) obren la possibilitat de seqüenciar el gen complet obtenint una millor resolució i, potencialment, una millor classificació taxonòmica.

#### **1.4.4.3.1. Seqüenciació de segona generació (NGS): Illumina MiSeq**

La NGS agrupa un seguit de plataformes de seqüenciació que es caracteritzen per reduir el temps d'anàlisi, el cost econòmic i per incrementar significativament les dades de seqüència obtingudes en comparació amb la seqüenciació de Sanger o seqüenciació de primera generació. Les NGS són capaces de realitzar milions de reaccions de seqüenciació simultànies en un procés anomenat seqüenciació massiva en paral·lel (Goodwin *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019). Tot i així, aquestes plataformes encara presenten algunes limitacions entre les quals destaca la curta llargada de les lectures (o *reads*), les quals habitualment es troben entre els 75 i 300 parells de bases (Goodwin *et al.*, 2016). Lectures per sobre aquesta llargada presenten una major taxa d'error i una disminució en la qualitat de lectura. Per aquest motiu, a la

segona generació també se l'anomena seqüenciació de lectura curta (*Short-read NGS*).

La plataforma NGS més utilitzada en estudis de microbiota és la tecnologia desenvolupada per Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) una plataforma de seqüenciació per síntesi (SBS) amb un sistema de terminació reversible cíclica (CRT) (Goodwin *et al.*, 2016). Després de l'amplificació del segment diana a seqüenciar, les còpies es col·loquen formant clústers sobre una placa sòlida dins la *flow cell* (Figura 8). A continuació, s'incorporen els reactius necessaris per a la reacció de polimerització: encebadors universals,



**Figura 8.** Base metodològica de la seqüenciació per síntesi d'Illumina. Cada fragment d'ADN a seqüenciar s'unix a la placa de la *flow cell* a través d'uns adaptadors. S'amplifiquen utilitzant com encebadors els adaptadors adjacents, formant un clúster de còpies. Finalment, es produeix la reacció de síntesi amb nucleòtids marcats amb fluorescència per identificar cadascun que s'incorpora a la cadena complementària, obtenint així la lectura del fragment.

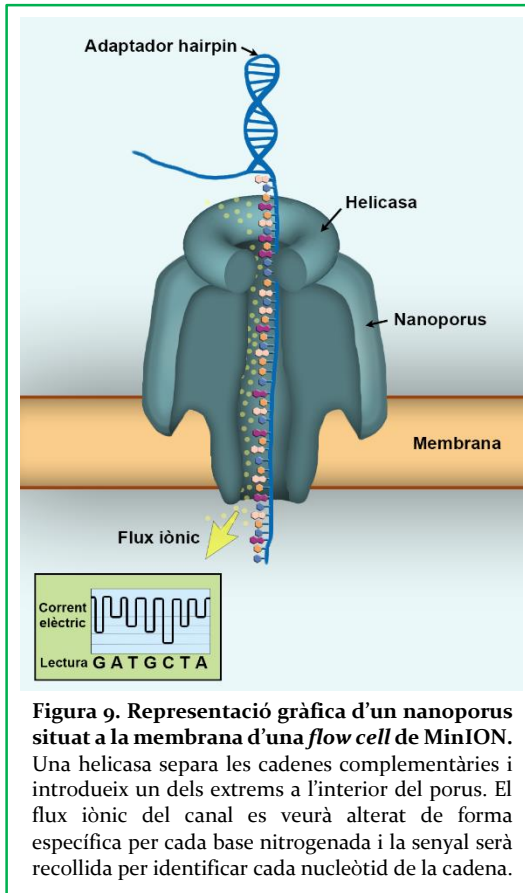
ADN polimerasa i nucleòtids. Els nucleòtids utilitzats porten incorporat un fluoròfor específic per a cada base nitrogenada i estan bloquejats en el seu extrem 3' per evitar una síntesi continuada. A partir d'aquest moment es produeix un procés cíclic de síntesi per crear una còpia complementària del segment diana a seqüenciar. L'ADN polimerasa incorpora el nucleòtid corresponent a la primera posició i, com que aquest està bloquejat, s'atura. Les plaques són irradiades amb un làser de 4 canals per estimular els fluoròfors i cada clúster emetrà la llum corresponent a la base nitrogenada incorporada durant aquest cicle. Finalment, els fluoròfors són eliminats, desbloquejant l'extrem 3' i permetent un nou cicle per incorporar el següent nucleòtid (Figura 8). Així, la cadena es va llegint base a base a mesura que es sintetitza aquesta còpia complementària.

Illumina és una plataforma molt consolidada amb un alt nivell de compatibilitat entre plataformes. És la més estandarditzada en estudis de microbiota i disposa de múltiples paquets de *software* compatibles adaptats al format de les seves lectures. Tot i així, presenta limitacions a l'hora de seqüenciar segments llargs, on no aconsegueix una resolució alta a nivell taxonòmic.

#### **1.4.4.3.2. Seqüenciació de tercera generació (TGS): ONT MinION**

La tercera generació de seqüenciadors sorgeix com a resposta de la principal limitació de les plataformes NGS: la complexitat i baixa eficiència en seqüenciar segments llargs del genoma i, en conseqüència, una certa incapacitat per detectar seqüències repetitives o grans reorganitzacions cromosòmiques. Les plataformes TGS, també anomenades seqüenciació de lectura llarga (*long-read NGS*), es caracteritzen per ser capaces de produir lectures completes de fins a 2 Mb i de realitzar la seqüenciació en temps real. Una lectura a temps real permet aturar la reacció de seqüenciació en qualsevol punt en cas que ja es disposi de la informació necessària, reduint així el temps i el cost del procediment (Ambardar *et al.*, 2016; Kumar *et al.*,





2019). Aquestes tecnologies són molt recents, de poc més d'una dècada des de la primera presentació, i per això encara disposen de marge d'optimització. De fet, la principal limitació de les TGS és l'alta taxa d'errors que comet durant la seqüenciació, al voltant del 10% actualment (Kumar *et al.*, 2019). No obstant això, aquestes tecnologies han aconseguit reduir en només 5 anys les seves taxes d'error en més de 10 punts percentuals, albirant un gran potencial a curt termini.

Al 2014 es va presentar una de les plataformes TGS més prometedores de les últimes dècades, amb uns 20 anys de desenvolupament previ (Kasianowicz *et al.*, 1996). MinION d'Oxford Nanopore Technologies (ONT, Oxford, UK) és la primera plataforma de seqüenciació portàtil i utilitza una tecnologia basada en l'ús d'una quadrícula de nanoporus biològics units a una membrana. La membrana separa dues solucions iòniques que permeten el pas d'un corrent elèctric a través dels nanoporus. Les molècules d'ADN que es volen seqüenciar es preparen incorporant un adaptador en un extrem per unir les dos cadenes complementàries (*hairpin*) i afegint a l'altre extrem un adaptador de reconeixement per a una helicasa. Els porus presenten en la seva entrada una proteïna helicasa que separa les dues cadenes de l'ADN i introdueix un dels extrems a l'interior del porus, travessant aquest canal

nucleòtid a nucleòtid. Cada una de les quatre bases nitrogenades que componen els nucleòtids altera el camp elèctric de manera específica. En passar pel nanoporus, l'alteració produïda és detectada per un sensor i s'identifica la base nitrogenada (Figura 9). D'aquesta manera, es produeix la lectura de la seqüència de l'ADN. Un cop s'ha llegit una de les cadenes, com la seva complementària està lligada a l'extrem final, es seqüenciarà a continuació, obtenint un *read* que conté les dues cadenes complementàries seguides. Com és un procés que utilitza pocs reactius, la reacció pot continuar tant de temps com sigui necessari fins obtenir el resultat desitjat (Goodwin *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019).

#### **1.4.4.4. Big data: gestió i processament de dades massives**

El processament de les dades extretes de la seqüenciació no és un procés senzill i per a l'estudi de la microbiota està poc estandarditzat. El procés es pot dividir en tres etapes: control de qualitat i pre-processament, classificació taxonòmica i estudis de profunditat. Qualsevol disseny experimental, a més, ha de comptar amb mètodes estadístics apropiats per discernir entre la variabilitat tècnica i els resultats biològics reals.

Durant la primera etapa es preparen les dades per a que aquestes tinguin el format adient i siguin de prou qualitat com per no esbiaixar els resultats. De forma universal, les plataformes de seqüenciació assignen un valor de qualitat a cada lectura segons la fiabilitat d'aquesta, normalment amb una puntuació de qualitat Phred. Existeixen multituds d'eines *software* que permeten mostrar aquestes dades de qualitat i filtrar cada *read* segons un llindar de qualitat, normalment descartant les lectures per sota de un Q-Phred de 30, que correspon a la probabilitat d'1 entre 1.000 de que una base nitrogenada sigui incorrecte (Ewing *et al.*, 1998). Aquests controls de qualitat també permeten eliminar quimeres, duplicats o altres artefactes de la metodologia. A més, durant aquesta etapa s'eliminen les seqüències que corresponen als adaptadors, als marcadors de *barcoding*, als *primers* i

qualsevol altre fragment que no correspongui al segment original. Finalment, aquesta fase pot incloure en alguns casos algorismes de *denoising* i rarefacció que descarten lectures residuals que probablement siguin fruit d'errors o de contaminació bacteriana.

La segona etapa té l'objectiu d'assignar un grup taxonòmic a cada lectura mitjançant la comparativa amb una base de dades que reculli les seqüències descrites de cada espècie bacteriana. Aquesta assignació depèn molt del tipus de seqüenciament que s'ha realitzat, de l'algorisme de classificació que s'utilitzi i de la base de dades que es faci servir. Existeixen diferents algorismes de classificació que utilitzen estratègies alternatives de comparativa entre seqüències per comparar la nostra seqüència amb la base de dades. Per exemple, es pot destacar Scikit-learn, un algorisme de “*machine learning*” basat en llenguatge Python que utilitza bases de dades entrenades en base al tipus de lectures que introdueixes (Pedregosa *et al.*, 2011); o Kraken, un algorisme dissenyat per seqüenciament metagenòmic que utilitza alineaments exactes de k-mers per alinear les mostres amb la base de dades i que ha servit com a base per a algorismes més específics com Braken o Dragen (Wood i Salzberg, 2014).

Per una altra banda existeixen diferents bases de dades de genomes bacterians entre les quals podem destacar Greengenes, que conté dades de referència del gen *16S* i dels grups principals d'*Archea* en un arxiu lleuger i ràpid de processar (McDonald *et al.*, 2011); SILVA, una base de dades més completa i actualitzada que conté els gens *16S*, *18S*, *23S*, *28S* i la majoria d'*Archea* aportant una gran resolució (Quast *et al.*, 2013); i la que ofereix el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), la més completa i actualitzada de totes (National Center for Biotechnology Information, 2021). Com més gran sigui una base de dades més acurada serà la classificació taxonòmica però es requereix una major potència i temps de computació.

Finalment, amb les dades taxonòmiques es poden realitzar estudis més profunds d'abundàncies diferencials, diversitat bacteriana o de funcions bacterianes. S'han desenvolupat paquets de programari que inclouen diferents *software* en una mateixa plataforma d'anàlisi amb l'objectiu d'estandarditzar el processament i fer els resultats més comparables entre laboratoris. Un dels paquets més utilitzats en estudis de microbiota és el *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) en la seva segona versió, dissenyat per comunitats bacterianes que han estat estudiades per seqüenciació d'amplicó d'un gen marcador (Bolyen *et al.*, 2019). Disposa de diferents complements per realitzar cadascuna de les etapes descrites, inclosos els estudis de profunditat. És una plataforma de codi obert que permet ampliar el programari i configurar-lo segons les necessitats de cada estudi.

Així, l'anàlisi de la microbiota seminal té el potencial d'esdevenir una nova eina per comprendre millor l'etiologia de la infertilitat masculina. L'anàlisi de la seva composició i la interacció que presenta amb altres paràmetres seminals i espermàtics pot ajudar en un futur a progressar en el diagnòstic i el tractament de la malaltia amb l'horitzó de millorar les expectatives reproductives de la població humana.



## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**



Davant la necessitat de buscar nous biomarcadors de la infertilitat masculina que ajudin a entendre l'etiologia de la malaltia, aquesta tesi doctoral s'ha enfocat en aprofundir en la nova línia de recerca que ha obert la microbiota seminal, amb les últimes evidències sobre la seva implicació observades en els estudis més recents. Tot analitzant la composició bacteriana del semen amb noves metodologies de seqüenciació, s'ha estudiat la seva interacció amb biomarcadors emergents relacionats amb la integritat del DNA espermàtic.

El projecte parteix de la hipòtesi següent:

La microbiota seminal té una implicació en la infertilitat masculina amb el potencial d'alterar paràmetres seminals i espermàtics relacionats amb la integritat de l'ADN espermàtic

L'estudi s'ha dividit en dues seccions on s'han plantejat els següents objectius per valorar la certesa de la hipòtesi plantejada:

### **BLOC 1: ESTUDI DE PARÀMETRES SEMINALS I ESPERMÀTICS**

El primer bloc es centra en avaluar els paràmetres seminals i espermàtics dels pacients infèrtils idiopàtics i dels donants control per comprovar com interaccionen entre ells. La incorporació d'un mètode nou al laboratori, el potencial oxidant-reductor com a mesura de l'estrès oxidatiu, fa necessària la seva posada a punt i l'estudi de la seva relació amb la resta de paràmetres. S'han marcat els següents objectius:

**Objectiu 1:** Posada a punt i valoració del sistema MiOXSYS com a mètode de mesura de l'estrès oxidatiu a partir del potencial oxidant reductor.

**Objectiu 2:** Estudiar la relació entre els diferents paràmetres espermàtics i seminals observats.



## **BLOC 2: MICROBIOTA SEMINAL I RELACIÓ AMB LA FERTILITAT**

El segon bloc inclou l'estudi de la microbiota seminal a través de la seqüenciació del gen *16S* per dues plataformes diferents i la implicació d'aquesta composició bacteriana en els valors observats dels paràmetres seminals i espermàtics. S'han establert els següents objectius:

**Objectiu 3:** Posada a punt del procediment de classificació taxonòmica de les lectures de seqüenciació per a la caracterització de la microbiota seminal.

**Objectiu 3.1:** De la plataforma Illumina

**Objectiu 3.2:** De la plataforma Oxford Nanopore Technologies

**Objectiu 4:** Caracterització bacteriana del semen i comparació dels resultats de les dues plataformes de seqüenciació emprades.

**Objectiu 5:** Estudiar la relació entre les abundàncies bacterianes observades i els diferents paràmetres espermàtics i seminals analitzats.

### **3. MATERIAL I MÈTODES**



### **3.1. Recollida i emmagatzematge de mostres**

#### **3.1.1. Procedència**

Amb la finalitat d'assolir els objectius proposats es van obtenir mostres de semen humanes d'individus residents a la regió occidental mediterrània, majoritàriament provinents de diferents regions espanyoles. Es va establir una col·laboració amb la clínica de reproducció assistida Instituto de Fertilidad de Palma i el centre d'anàlisi genètica Genosalut per disposar d'ejaculats de pacients infèrtils. Les mostres seminals d'individus control de població general i de fertilitat provada es van recollir a les instal·lacions de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

#### **3.1.2. Consentiment informat i comitè d'ètica**

Previ a la recollida, tots els individus participants en l'estudi, tant pacients com controls, van ser degudament informats de l'objecte d'estudi d'aquest projecte i de la utilització exclusiva de la seva mostra per a la recerca científica, així com del tractament de les seves dades segons la llei orgànica 3/2018 LOPD, signant el document informatiu per constatar el seu consentiment (Annex 1).

Els procediments realitzats sobre aquestes mostres van ser aprovats amb anterioritat a la seva aplicació per un comitè d'ètica (número de registre 2014676) i s'han dut a terme d'acord amb les directrius i les normatives del Codi d'Ètica de l'Associació Mundial (Declaració d'Hèlsinki).

#### **3.1.3. Grups de pacients i controls**

Es van recollir un total de 56 mostres seminals d'individus de diferents etiologies, principalment caucàsics de la conca mediterrània. Es va documentar el lloc de naixement i les localitats de residència en els 10 últims anys de cadascun dels participants de l'estudi, així com informació sobre els seus hàbits de consum, exposició laboral a agents químics i físics i historial

mèdic que pugin influir en la composició de la microbiota seminal (Annex 2). La mitjana d'edat dels individus ha estat de 38,18 [25-48].

Del total de mostres, 42 corresponen a pacients normozoospermics amb problemes d'infertilitat idiopàtica i sense factor femení conegut que van acudir a la clínica de fertilitat majoritàriament per fallades d'implantació i avortaments de repetició. En aquest grup es van descartar els principals factors d'infertilitat masculina ja descrits a la literatura, com el varicocele, per tal d'evitar que aquests factors poguessin alterar l'observació de la possible implicació de la microbiota seminal.

El grup control està constituït per les 14 mostres seminals restants classificades en dos grups: (i) 8 mostres de donants de població general i (ii) 6 mostres de donants amb fertilitat provada.

#### **3.1.4. Protocol d'obtenció de mostres de semen**

Les mostres de semen de tots els participants es van obtenir mitjançant un acurat protocol per reduir la possible contaminació genètica externa que pugui provenir tant de la pell del penis i la mà, com dels estris utilitzats durant el procediment. El protocol és una adaptació del procediment descrit al manual "*WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*" cinquena edició publicat a 2010 per a la recollida estèril de semen per a anàlisis microbiològics (World Health Organization, 2010).

Previ al procés de recollida, la sala on es va dur a terme i el material necessari per a la recollida de la mostra es va desinfectar amb una solució de lleixiu diluït 1:50 amb aigua i es va restringir l'accés a qualsevol persona. Totes les mostres van ser recollides després d'un període d'abstinència sexual d'entre dos i set dies.

Protocol: En primer lloc, el donant va orinar per tal de netejar la uretra de restes de fluids anteriors. A continuació, es va rentar les mans exhaustivament amb aigua tibia i sabó, prenent especial atenció als espais

interdigitals i les ungles. Es va rentar també el penis amb aigua tibia i sabó, dedicant especial atenció a la zona del gland i del solc coronal. Les mans i el penis es van eixugar amb gases estèrils d'un sol ús evitant el contacte amb la roba o altres objectes. Finalment es va procedir a la recollida de la mostra de semen per masturbació i ejaculant en un pot estèril, evitant el contacte del penis amb les parets interiors. En acabar, el pot es va tancar fins a la completa líquüefacció de la mostra a temperatura ambient durant un mínim de 30 minuts.

### **3.1.5. Criopreservació i descongelació de mostres de semen**

L'emmagatzematge de les mostres de semen es va realitzar en criotubs estèrils dividint la mostra en alíquotes d'entre 90 i 500 µL depenent del volum seminal necessari per a cada tècnica d'anàlisi posterior. No es va utilitzar cap medi de criopreservació per evitar la contaminació bacteriana o de material genètic, que no pot ser evitada en cap solució comercial o d'elaboració pròpia.

Els tubs es van submergir en un tanc de nitrogen líquid (-195°C) per a una ràpida congelació que evités la formació de cristalls de gel intracel·lular. Les alíquotes destinades a l'anàlisi de fragmentació d'ADN espermàtic per mitjà de l'assaig Comet van ser emmagatzemades en un ultracongelador a -80°C.

El transport de les mostres entre els diferents centres participants es va realitzar en condicions adequades per mantenir l'estat de congelació, utilitzant gel sec a aproximadament -80°C i recipients de poliestirè expandit degudament segellats.

En el moment de l'anàlisi, es van descongelar únicament les alíquotes destinades a la tècnica a realitzar. Cada tub retirat del tanc de nitrogen líquid es va descongelar a temperatura ambient en la superfície de treball. Immediatament després de la seva completa descongelació, es va recollir el contingut del criotub amb una pipeta Pasteur i es va traspasar al tub de microcentrifuga per iniciar la tècnica d'anàlisi.

## BLOC 1: ESTUDI DE PARÀMETRES SEMINALS I ESPERMÀTICS

### 3.2. Tècniques d'anàlisi seminal

En aquest estudi s'han escollit paràmetres àmpliament utilitzats com a biomarcadors d'infertilitat tant en l'àmbit clínic com en el de recerca, seleccionant tècniques que s'han descrit com les més sensibles i específiques o les més innovadores amb gran potencial diagnòstic. A continuació es detalla el protocol i les condicions en que es van dur a terme cadascuna d'elles.

#### 3.2.1. Seminograma

El seminograma és l'eina diagnòstica més utilitzada en el diagnòstic de la infertilitat masculina i consisteix en un conjunt de tècniques de laboratori enfocades en l'estudi de les propietats macroscòpiques i microscòpiques del semen per avaluar el seu potencial fèril.

Les propietats macroscòpiques corresponen a aspectes que es poden observar i caracteritzar a ull nu per l'investigador. S'han analitzat el volum, el pH i la viscositat seminal. El volum seminal es va mesurar mitjançant una pipeta Pasteur estèril graduada i per al pH seminal es van utilitzar tires reactives de pH d'un rang entre 6 i 10 amb increments de 0,3 unitats. Respecte a la viscositat seminal, es va utilitzar el procediment descrit per Rijnders que consisteix en utilitzar un portaobjectes d'anàlisi seminal Leja de 2 cambres de 20 µm de profunditat (Microptic, Barcelona, Espanya) i calcular el temps en segons que necessita una mostra per omplir-la per capil·laritat (Rijnders *et al.*, 2007). Posteriorment, s'extrapola el resultat obtingut a centipoise (cps), unitat de viscositat dinàmica del Sistema Cegesimal d'Unitats (CGS), amb un gràfic que relaciona el temps d'ompliment de la cambra amb els centipoise equivalents. Les mesures del temps d'ompliment es van realitzar per duplicat i es va calcular la mitjana, amb la qual es van extrapolar els centipoise.

Les propietats microscòpiques fan referència a les diferents característiques cel·lulars de les mostres seminals. En aquest estudi s'han analitzat la concentració, motilitat i morfologia espermàtiques. Es va utilitzar un portaobjectes d'anàlisi seminal Leja de 4 cambres i el programa informàtic Sperm Class Analyzer (SCA) (Microptic) que, mitjançant la captura d'imatges al microscopi, mesura la concentració espermàtica i la motilitat, aquesta última classificada en diferents categories segons el tipus de moviment dels espermatozoides: progressius (A), no progressius (B) i immòbils (C).

Per analitzar la morfologia espermàtica, es van preparar frotis per duplicat amb una solució espermàtica en solució salina (PBS) amb una concentració de 4-8 espermatozoides per mil·lilitre. Les preparacions es van fixar amb la tinció SpermBlue (Microptic) que permet, a més, tenyir de forma diferenciada les diferents parts de l'espermatozoide (acrosoma, cap, peça intermèdia i cua) amb diferents intensitats de blau. Posteriorment, es van observar un mínim de 200 espermatozoides per rèplica classificant-los en normals o anòmals seguint el criteri establert per l'OMS en la cinquena edició del seu manual (World Health Organization, 2010). Un únic investigador va examinar les preparacions per evitar biaix interpersonal.

**Taula 3. Valors de referència dels paràmetres seminals i espermàtics valorats al seminograma segons l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organization, 2010).**

Paràmetre	Valor de referència
Volum (ml)	1,5
pH	≥ 7,2
Concentració espermàtica (espermatozoides/ml)	15 x 10 <sup>6</sup>
Nombre total d'espermatozoides (nº espermatozoides)	39 x 10 <sup>6</sup>
Motilitat total (% d'espermatozoides A+B)	42
Motilitat progressiva (% d'espermatozoides A)	32
Morfologia (% de formes normals)	4



La qualitat seminal de cada mostra es va valorar segons els criteris de l'OMS, la qual estableix uns valors llindar de normalitat per a cadascun dels paràmetres recollits al seminograma, resumits a la Taula 3.

### **3.2.2. Fragmentació de l'ADN espermàtic**

La integritat de l'ADN espermàtic és un paràmetre que presenta algunes dificultats en la seva valoració. La mesura dels trencaments del material genètic es pot abordar amb diferents tècniques però, segons l'aproximació escollida, els resultats poden ser lleugerament diferents. Amb aquesta premissa, en aquest estudi es van utilitzar les dues tècniques que presenten una major sensibilitat i especificitat (Ribas-Maynou *et al.*, 2013) per tal d'obtenir una visió més precisa de l'estat d'integritat de l'ADN espermàtic, l'assaig TUNEL i l'assaig Comet.

#### **3.2.2.1. Assaig TUNEL**

Per a l'assaig TUNEL es va utilitzar el kit comercial *In Situ Cell Death Detection* (Ref.11684795910, Roche Diagnostic GmbH; Penzberg, Alemanya) amb un protocol adaptat específicament per espermatozoides humans i analitzat mitjançant citometria de flux al Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) de la UAB.

#### Reactius i solucions requerides

Tampó fosfat salí (PBS) 1X	Solució aquosa salina 10X que conté NaCl 1,37M, KCl 27mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM ajustada a pH 7,4 i diluïda amb aigua desionitzada en una proporció 1:10. Reactius de Merck (Merck KGaA; Darmstadt, Alemanya).
----------------------------	---

PBS/1%BSA	Tampó fosfat salí suplementat amb 1% d'albumina de sèrum boví (BSA). Es pesen 100 mg de BSA (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemanya) i es dissolen en 10 ml de PBS 1X per a preparar 10 mL de PBS/1%BSA. Pot emmagatzemar-se a -20°C.
Solució de fixació	Solució al 4% de paraformaldehid (PFA). Es pesen 0,04 g de PFA (Sigma-Aldrich) i es dissolen en 1 mL de PBS 1X en un bany a 72°C durant 1h agitant la barreja freqüentment. S'ha de preparar en el moment previ a la utilització i utilitzant una cabina d'extracció de gasos.
Solució de permeabilització	Solució al 0,1% de Triton X-100 en citrat de sodi al 0,1%. Es pesen 10 mg de citrat de sodi (Merck KGaA) i es dissolen en 9,9 mL d'aigua desionitzada en constant agitació. Posteriorment s'afegeixen 10 µl de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a la solució. Conservació a -20°C.
Solució de marcatge	<i>L'In Situ Cell Death Detection</i> kit inclou una solució de dUTPs marcats amb fluorocroms i una solució amb l'enzim transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT).
Solució de fragmentació	Desoxiribonucleasa I (DNsa I) dissolta en una solució de Tris-HCl 100 mM. Es pesen 0,6057 g de Tris en menys de 100 mL d'H <sub>2</sub> O i s'ajusta el pH a 7,5 afegint HCl. Posteriorment s'afegeix 1 mL de Tris-HCl en el flascó de 2000 U de DNsa i es preparen alíquotes de 50 µl per conservar-les a -20°C. Reactius de Sigma-Aldrich.

### Protocol

Preparació de la mostra: La mostra es va descongelar a temperatura ambient fins la seva líquüefacció total i es van transferir 400 µl a un tub de centrífuga de 10 ml. Es va mantenir la mostra en una gradeta refrigerada a 2-8°C durant tot el procediment per evitar la generació de nous trencaments en l'ADN. Es van realitzar tres rentats afegint PBS 1X al tub fins omplir-lo, invertint-lo per barrejar el contingut i centrifugant a 400 g durant 4 minuts. Es va decantar el sobrenedant gairebé completament i es va resuspendre el pellet en el líquid restant abans de tornar a omplir de PBS per evitar agrupacions d'espermatozoides. Després de l'últim rentat, es va resuspendre el pellet en PBS/1%BSA ajustant la concentració a 5 milions d'espermatozoides per mL. En tres tubs de microcentrífuga de 0,5 mL es van transferir uns 300 µl de solució cel·lular i es van rentar dues vegades amb 200 µl de PBS/1%BSA centrifugant a 800 g durant 4 minuts i retirant el sobrenedant amb una micropipeta amb precaució per evitar desprendre el pellet de la paret. El pellet final ha de ser d'uns 2 mm aproximadament. Si és més petit, es poden afegir uns µl més de mostra de la solució després del primer rentat.

Fixació: La mostra espermàtica es va resuspendre en 100 µl de PBS/1%BSA i 100 µl de solució de fixació barrejant breument amb un vòrtex. Es van incubar les cèl·lules en aquest medi durant 1h a temperatura ambient i agitació suau. Un cop fixada la mostra, es va centrifugar a 800 g durant 5 minuts, es va descartar el sobrenedant i es va rentar un cop amb 200 µl de PBS/1%BSA per eliminar les restes de paraformaldehid.

Permeabilització de la membrana espermàtica: Per tal de permeabilitzar la membrana i permetre l'entrada dels reactius de marcatge a l'interior de la cèl·lula i el nucli, es van tractar les membranes cel·lulars amb detergent. Es va resuspendre la mostra fixada en 100 µl de solució de permeabilització i es va incubar durant 2 minuts a 2-8°C. Es va centrifugar a 800 g durant 5 minuts, es va descartar el sobrenedant i es va rentar un cop amb 200 µl de PBS/1%BSA per eliminar les restes de detergent Triton X-100.

Preparació del control positiu: Es va incubar un dels triplicats en 50 µl de solució de fragmentació amb ADNsa I durant 10 minuts a 37°C per produir trencaments massius a l'ADN d'aquestes cèl·lules. A continuació, es va eliminar l'ADNsa I amb un rentat en 200 µl de PBS/1%BSA i retirant el sobrenedant. Les dues alíquotes restants es van mantenir en una gradeta refrigerada a 2-8°C durant tot aquest pas.

Marcatge del material genètic: Es van afegir 22,5 µl de solució de dUTPs marcats i 2,5 µl de TdT (solució de marcatge) als tubs de microcentrífuga corresponents al control positiu i la mostra problema. Es van afegir 25 µl de solució de dUTPs sense enzim TdT al tub del control negatiu. La solució de marcatge es va manipular a 4°C i en fosc en una cabina d'extracció de gasos degut a la seva alta toxicitat i es van seguir les mesures de seguretat del fabricant tant en l'anàlisi com en la gestió dels residus generats. Es van incubar les mostres durant 1h a 37°C en agitació suau. Es van centrifugar els tubs a 800 g durant 5 minuts i es van rentar dues vegades amb 200 µl de PBS/1%BSA per retirar la solució de marcatge. Acabada aquesta etapa, es poden emmagatzemar les mostres amb poc sobrenedant a 4°C protegit de la llum fins aproximadament 1 setmana.

Anàlisi per citometria de flux: Es va resuspendre la mostra processada en 400 µl de PBS i es va transferir el contingut a un tub de citòmetre. Es va mantenir en fosc fins al moment de l'anàlisi. El citòmetre de flux (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA) va realitzar el processament de les dades mitjançant una connexió a un ordinador amb el *software* CELLQUEST (Becton Dickinson). Es van comptabilitzar 10.000 espermatozoides per cada mostra i controls utilitzant un filtre de 530 nm ± 30 nm a un flux de 200-300 espermatozoides per segon per detectar la fluorescència (FICT). Es van classificar les cèl·lules en fragmentades o no fragmentades utilitzant el control negatiu com a valor llindar a partir del qual es considera fragmentació elevada. El resultat es va expressar en percentatge de cèl·lules que presenten fragmentació a l'ADN.

### 3.2.2.2. Assaig Comet

Aquest estudi es va portar a terme al Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona (CIMAB) i, donada l'expertesa necessària en la valoració dels resultats, va ser realitzat per un únic investigador per tal de reduir al màxim el biaix interpersonal.

#### Reactius i solucions requerides

Solució d'agarosa al 1%	Solució d'agarosa de baix punt de fusió en una concentració de 1% en aigua desionitzada.
Tampó fosfat salí (PBS) 1X	Solució aquosa salina 10X que conté NaCl 1,37M, KCl 27mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20mM ajustada a pH 7,5 i diluïda amb aigua desionitzada en una proporció 1:10. Reactius de Merck KGaA.
Solucions de lisi	Dues solucions a pH 7,5 que contenen: 1) 0,8M Tris-HCl, 0,8M DTT, 1% SDS 2) 0,4M Tris-HCl, 50mM EDTA, 2M NaCl, 0,4M DTT
Tampó TBE 1X	Dilució 1:10 en aigua desionitzada de la solució comercial de TBE 10X (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) a pH 8,5.
Tampó de NaOH	Solució de NaOH 0,03M en aigua desionitzada i ajustat a pH 12,2.
Solució de desnaturalització	Solució de NaOH 0,03M i NaCl 1M en aigua desionitzada i ajustat a pH 12,0.

Solució de neutralització	Solució de Tris-HCl a 0,4M en aigua desionitzada ajustada a pH 7,5.
Etanol	Preparacions d'etanol diluït en aigua desionitzada al 70%, 90% i 100%.

### Protocol

Preparació de la mostra i lisi cel·lular: Un cop la mostra seminal va ser descongelada es van realitzar dos rentats amb PBS 1X per a retirar el líquid seminal i obtenir els espermatozoides en un pellet. Un cop obtingut el pellet, es va ajustar la concentració d'espermatozoides a  $1 \times 10^6$ /mL. Seguidament, es va barrejar 100  $\mu$ L amb una solució d'agarosa a l'1% i es van realitzar preparacions en portaobjectes amb una pel·lícula d'agarosa, prèviament preparada, per duplicat. Es van mantenir a 4°C durant un mínim de 5 minuts per gelificar l'agarosa i aconseguir una fina capa de gel electroforètic sobre el portaobjectes. Es van submergir les preparacions en dues solucions de lisi consecutives que, respectivament, eliminen les membranes plasmàtiques dels espermatozoides i trenquen les unions entre les protamines i l'ADN espermàtic. Aquest tractament permet descompactar el material genètic i deixar les cadenes d'ADN lliures, dispersant-se així al voltant del nucli cel·lular. A continuació es van rentar els portaobjectes en TBE 1X per retirar les restes cel·lulars que queden en suspensió després de la lisi.

Electroforesi: Les condicions de pH en les que es porta a terme la electroforesi són les que permeten valorar de forma específica la fragmentació de cadena doble i la de cadena senzilla. Així, el tractament aplicat a cada portaobjectes va ser, en aquesta etapa, diferent. L'electroforesi en condicions neutres es va realitzar a 20V durant 12,5 minuts en un tampó TBE a pH 8,5, mentre l'electroforesi en condicions alcalines va requerir un pas previ de desnaturalització de l'ADN amb NaOH i NaCl a pH 12 i la posterior electroforesi a 20V durant 4 minuts en un tampó de NaOH a pH 12,2.

Fixació i tinció: Els portaobjectes es van rentar en solució de neutralització per evitar que les solucions electroforètiques alteressin les mostres en passos posteriors i es van deshidratar amb banys d'etanol al 70%, 90% i 100% de 2 minuts cadascun. Finalment, es van deixar assecar horitzontalment a temperatura ambient. Un cop les preparacions van estar seques, es van tenyir amb DAPI SlowFade Gold anti-fade (Invitrogen; OR, USA).

Anàlisi en microscòpia de fluorescència: Les mostres es van observar amb un microscopi de fluorescència i es van valorar un total de 400 espermatozoides per cada portaobjectes, classificant les cèl·lules en fragmentades i no fragmentades seguint els criteris descrits per l'equip del Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona (Casanovas *et al.*, 2019).

### **3.2.3. Potencial oxidant-reductor mitjançant MiOXSYS**

Per tal de valorar l'equilibri oxidatiu com a mesura de l'estrès oxidatiu, en aquest estudi es va calcular el potencial oxidant-reductor de les mostres utilitzant el sistema MiOXSYS, de recent desenvolupament i específicament dissenyat per a analitzar mostres seminals humanes.

#### Protocol

Es van descongelar les mostres a temperatura ambient fins assolir una temperatura d'entre 15 i 30°C. Donat que les mostres seminals s'han d'analitzar per MiOXSYS abans de la primera hora després de la líquüefacció, es van valorar immediatament després de la descongelació. Per cada mostra analitzada, es va introduir el sensor MiOXSYS d'un sol ús en el connector de l'aparell i es van aplicar 30 µL de mostra en la cel·la de fibra del sensor cobrint tota la superfície on, per capil·laritat, entra en contacte amb els elèctrodes del sensor. Després d'aproximadament 5 minuts, es va obtenir el valor del potencial oxidant-reductor estàtic en milivolts i es va retirar i eliminar el sensor seguint les instruccions de gestió de residus del fabricant. Finalment, es va normalitzar el valor del ORP per la concentració espermàtica de la

mostra mitjançant una divisió per obtenir un resultat final expressat en mV/10<sup>6</sup> espermatozoides mL.

També es va normalitzar el valor del ORP per la viscositat i el pH seminals per obtenir valors que minimitzessin l'impacte d'aquests dos paràmetres sobre el càlcul del potencial elèctric (Annex 3: Garcia-Segura et al. 2020). Tots dos càlculs es van realitzar pel mateix procediment descrit anteriorment, obtenint valors expressats en mV/cps i en mV/U pH.

#### Calibratge i controls de l'aparell

Amb periodicitat mensual es va verificar el calibratge mitjançant una clau subministrada pel fabricant amb elèctrodes que han de marcar uns valors compresos entre 99 i 101 mV i entre -101 i -99 nA per a la cara A i entre 295,8 i 304,2 mV i -30,4 i 29,6 nA per a la cara B.

Es van realitzar controls de qualitat externs per a cada lot de sensors nou mitjançant dues solucions subministrades pel fabricant que funcionen com a control de valors mínims i màxims, respectivament.

#### **3.2.4. Test de la Cromomicina A3**

Per valorar l'estat de compactació de la cromatina dels gàmetes masculins s'ha utilitzat una tinció amb cromomicina A3 seguint un protocol adaptat per espermatozoides per el nostre grup de recerca (Ribas-Maynou *et al.*, 2020) i detallat a continuació.

#### Reactius i solucions requerides

Tampò fosfat salí (PBS) 1X Solució aquosa salina 10X que conté NaCl 1,37M, KCl 27mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM ajustada a pH 7,4 i diluïda amb aigua desionitzada en una proporció 1:10. Reactius de Merck KGaA.



Solució de permeabilització	Dilució al 0,5% de Triton X-100 en tampó fosfat salí. Es barregen 250 µL de solució comercial Triton X100 al 2% (Sigma-Aldrich) per cada mil·lilitre de PBS.
Tampó McIlvaine	Solució composta per àcid cítric 0,1M i Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M ajustada a pH 7 i suplementada amb MgCl <sub>2</sub> 1M en el moment de la seva utilització.
Solució de tinció	Es pesen 10 mg de CMA3 d' <i>Streptomyces griseus</i> ≥95% (Sigma-Aldrich) i es dissolen en 2 mL d'etanol 100%. Aquesta solució ha d'estar protegida de la llum, manipulada en cabina d'extracció de gasos i gestionar els residus com a material tòxic. Es pot emmagatzemar a -20°C.

### Protocol

Permeabilització de la membrana plasmàtica: Es van rentar dues vegades 100 µL de la mostra descongelada amb PBS 1X en un tub de microcentrífuga de 2 mL, centrifugant a 400 g durant 4 minuts i retirant el sobrenedant per decantació. Per tal de permetre l'entrada de la CMA3 a l'interior de la cèl·lula i el nucli, es van tractar les membranes cel·lulars per fer-les més permeables utilitzant un detergent. Es va resuspendre el pellet després del segon rentat amb el poc líquid restant i es va incubar la mostra en 500 µL de solució de permeabilització durant 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va rentar en PBS 1X centrifugant a 400 g durant 5 minuts per retirar les restes de detergent. Es va resuspendre el pellet resultant en PBS 1X fins a una concentració espermàtica d'uns 10 milions/mL.

Extensió cel·lular i tinció: Utilitzant un portaobjectes desengreixat prèviament amb metanol, es va realitzar una extensió cel·lular precipitant un parell o tres de gotes separades sobre la superfície del vidre i es va deixar eixugar a l'aire a temperatura ambient. Un cop seca l'extensió, es van barrejar 2,5 µL de solució de tinció amb 47,5 µL de tampó McIlvaine i es van afegir els 50 µL resultants sobre el portaobjectes. Es va cobrir la superfície amb un rectangle de parafilm tallat a la mida del portaobjectes i es va incubar durant 20 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Després, es va retirar el parafilm amb unes pinces i amb cura de no fregar la superfície on està la mostra i es va retirar l'excés de solució de tinció amb la punta d'un paper de filtre per capil·laritat. Finalment, es va deixar eixugar a l'aire, es va aplicar una contra-tinció amb 2 gotes de DAPI Slowfade Gold antifade (Thermo Fisher Scientific; Waltham MA, USA) i es va col·locar un cobreobjectes per protegir la mostra.

Observació al microscopi de fluorescència: Es van observar i valorar uns 200 espermatozoides per cada gota de mostra precipitada al portaobjectes, amb un mínim de 400 espermatozoides comptats en total. Utilitzant un filtre fluorescent de color blau, els espermatozoides sense deficiències van mostrar un nucli tenyit de color blau corresponent al DAPI, mentre els espermatozoides amb anomalies de compactació de la cromatina es van tenyir de groc per la presència de CMA3 (barreja del blau del DAPI i el verd de la CMA3). Els resultats van expressar-se en percentatge d'espermatozoides amb deficiències de compactació respecte del total.

## BLOC 2: MICROBIOTA SEMINAL I RELACIÓ AMB LA FERTILITAT

### 3.3. Disseny experimental per a l'estudi de la microbiota seminal

La identificació de bacteris en un medi requereix un procés meticulós de processament de la mostra. En aquest projecte es va utilitzar la seqüenciació del gen bacterià *16S* per caracteritzar la població microbiana, el que comporta l'extracció de l'ADN de la mostra biològica, l'amplificació del gen en qüestió i la preparació de la llibreria genètica. Posteriorment, es van utilitzar dues plataformes de seqüenciació de nova generació (*Next Generation Sequencing*, NGS) diferents per obtenir una caracterització més acurada de la microbiota i poder comparar els resultats obtinguts en ambdós sistemes. Es va escollir Illumina (San Diego CA, USA), una plataforma de segona generació àmpliament utilitzada en la caracterització de la microbiota, i Oxford Nanopore Technologies (ONT; Oxford, UK), una plataforma de seqüenciació emergent de tercera generació que permet seqüenciar a temps real cadenes llargues d'ADN.

Es va crear una base de dades amb informació personal i clínica de cada donant i pacient on es van recollir variables que poden influir en la composició de la microbiota (Gubert *et al.*, 2020; Parata *et al.*, 2020; Zimmermann i Curtis, 2020). Aquesta base de dades constitueix el que s'anomena metadata, i inclou:

- Municipi de naixement
- Municipi/s de residència durant els últims 10 anys
- Edat
- Consum de tabac, alcohol, drogues, cafeïna i anàlegs
- Consum de dieta específica
- Exposicions laborals a radiació o agents químics tòxics
- Historial clínic relacionat amb l'aparell reproductor
- Consum de medicaments o possibles tractaments clínics

Es va establir un protocol exhaustiu de control de contaminacions bacterianes amb la incorporació de controls negatius en diferents passos del procediment (recollida de mostra, extracció d'ADN i amplificació per PCR) per identificar les possibles espècies contaminants i considerar-les en el moment de l'anàlisi. Aquests controls negatius es van seqüenciar a través de la plataforma de Illumina per la seva millor capacitat de detecció (veure secció 4.3). També es va utilitzar una *mock community* comercial (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard; Zymo Research, CA, EEUU) com a control positiu, que consisteix en una mostra amb una comunitat bacteriana de composició coneguda per posar a punt l'anàlisi bioinformàtic i comprovar la qualitat de la seqüenciació.

El disseny experimental detallat a continuació recull totes les consideracions de l'apartat 1.4.4. de la introducció i explica exhaustivament el procediment que es va dur a terme per obtenir resultats de caracterització de la microbiota.

### **3.3.1. Extracció i purificació de l'ADN bacterià**

Previ a la descongelació de les mostres, es va esterilitzar una cabina de flux laminar horitzontal mitjançant productes específics que eliminen material viu i degraden l'ADN. També es va netejar amb el mateix producte tot el material necessari per a l'extracció de l'ADN i es va introduir a la cabina que, a continuació, es va irradiar amb llum ultraviolada durant un mínim de 30 minuts. L'investigador es va equipar amb una bata utilitzada únicament per a aquest procediment i es va netejar els guants amb etanol abans de començar a treballar en la cabina. Un cop posada en marxa la cabina, es va col·locar un escovilló estèril a l'interior, prop de la zona de treball, com a control ambiental.

Per a l'extracció d'ADN bacterià es va fer servir el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Microprep kit (Zymo Research) amb un protocol lleugerament modificat al que proporciona el fabricant. Es va descongelar la mostra a temperatura ambient i, ja a l'interior de la cabina de flux laminar,

es van transferir 250 µL en el tub de lisi ZR BashingBead, que conté unes petites esferes de 0,1 mm. Es van afegir 750 µL de solució de lisi i es va tancar el tub amb fermesa abans de col·locar-lo en un sacsejador, configurat a màxima velocitat, durant 15 minuts. En aquesta etapa les esferes i la solució de lisi trenquen les parets i les membranes bacterianes física i químicament, respectivament, per alliberar l'ADN contingut a l'interior. A continuació, per eliminar totes les restes cel·lulars, es va centrifugar el tub a 10.000 *g* durant 1 minut i es va transferir tot el sobrenedant al filtre Zymo-Spin III-F introduït en un tub col·lector. Es va centrifugar a 8.000 *g* durant 1 minut i es va descartar el filtre.

El següent pas va ser capturar el material genètic per purificar-lo. Es van afegir 1.200 µL de DNA Binding Buffer al líquid filtrat en el pas anterior barrejant-los bé amb un vòrtex. Es van transferir 800 µL de la solució en una columna de filtratge Zymo-Spin IC-Z introduïda en un tub col·lector i es va centrifugar a 10.000 *g* durant 1 minut. Es va descartar el líquid eluït i es va repetir el pas anterior. En aquesta etapa, molècules presents en la solució Binding Buffer s'uneixen a l'ADN i, al passar per la columna de filtratge, es queden adherides al filtre. El líquid eluït, doncs, al no tenir ADN es descarta. Seguidament, es van introduir 400 µL de DNA Wash Buffer 1 en la columna on es trobava l'ADN i es va col·locar en un nou tub col·lector. Es va centrifugar a 10.000 *g* durant 1 minut i es va descartar l'elució. Es va tornar a rentar l'ADN dos cops més amb 700 i 200 µL de DNA Wash Buffer 2 respectivament, centrifugant 1 minut a 10.000 *g* i descartant després l'elució.

Finalment, per fer eluir l'ADN, es va transferir la columna a un tub de microcentrífuga de 1,5 mL, afegint 20 µL d'aigua sense nucleases en la matriu de la columna, i es va incubar durant 1 minut. Després, es va centrifugar a 10.000 *g* durant 1 minut per recollir l'ADN. Es va preparar la columna de filtratge Zymo-Spin II-µHRC introduint-la en un tub col·lector, afegint-hi 600 µL de solució HRC Prep i centrifugant a 8.000 *g* durant 3 minuts. Es va transferir l'ADN eluït a la nova columna, que es va col·locar en un tub de

microcentrífuga de 1,5 mL i es va centrifugar a 16.000 *g* durant 3 minuts. El líquid eluït conté l'ADN extret i purificat de les mostres seminals, on s'inclou tant l'ADN bacterià desitjat com l'ADN espermàtic humà. Es pot emmagatzemar a -20°C fins el seu anàlisi.

### 3.3.2. Amplificació del gen *16S* i preparació de la llibreria genètica de la plataforma ONT

Per tal que els resultats obtinguts per les dues plataformes de seqüenciació siguin comparables, es va establir un protocol gairebé idèntic d'amplificació i purificació de les mostres per minimitzar les possibles alteracions produïdes pel procediment metodològic.

#### CAIXA DE CONCEPTES 2: Seqüenciació

**Adaptadors:** seqüències curtes d'ADN específiques de cada plataforma de seqüenciació que s'uneixen a l'amplió per permetre la reacció.

**Índexs o barcodes:** seqüències curtes que marquen l'ADN d'una mostra de manera única dins una barreja.

**Read o lectura:** seqüència obtinguda del seqüenciador

**Tag:** oligonucleòtid afegit als *primers* que presenta una regió homòloga als índex per permetre la seva unió durant la segona PCR.

L'amplificació del gen *16S* es va portar a terme amb una doble reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per amplificar l'ADN i incorporar els índex i adaptadors necessaris per a la seqüenciació ONT a l'hora que es reduïa a la mínima expressió la quantitat d'ADN humà present al producte final.

#### Primera PCR: amplificació del gen *16S* i preparació de la mostra

La primera PCR té com a diana d'amplificació el gen *16S* complet. Així, es van utilitzar els *primers* universals 27F i 1492R descrits per Weisburg (Weisburg *et al.*, 1991) que permeten amplificar les 9 regions hipervariables del gen, modificats amb l'addició d'un *tag* específic per a la indexació de les mostres i la incorporació dels adaptadors de la plataforma ONT (Taula 4).

Aquesta PCR es va realitzar amb l'ADN polimerasa Phusion Hot Start II Taq HIFI (Thermo Fisher Scientific), un enzim molt precís optimitzat per reduir

els errors de polimerització i produir amplificats d'alta fidelitat a l'original. Aquesta característica és molt important per reduir la quantitat de bases errònies en les lectures, especialment quan es pretén seqüenciar amb la plataforma ONT, que encara presenta una alta taxa d'error. A continuació es va ajustar la concentració dels reactius i es va programar el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems; Waltham MA, USA) per realitzar 25 cicles d'amplificació en les condicions detallades a la Taula 5.

La mostra seminal no va ser centrifugada prèviament per separar les cèl·lules humanes del plasma seminal per la possible presència de bacteris adherits a la membrana dels espermatozoides. Per aquest motiu, malgrat l'amplificació específica d'un gen exclusivament bacterià, el producte final encara conté un percentatge elevat d'ADN humà, fet comprovat amb l'alineament de les lectures amb bases de dades del genoma humà. Aquest producte amplificat es pot emmagatzemar a -20°C fins el pròxim pas del protocol.

**Taula 4. Seqüència dels primers degenerats utilitzats per amplificar el gen ribosomal 16S complet.** Porten un *tag* específic per a incorporar els índex i adaptadors de la plataforma ONT.

27 Forward	<u>TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGRGTTTGATYHTGGCTCAG</u>
1492 Reverse	<u>ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTACCTTGTTAYGACTT</u>

\*la part subratllada correspon al *tag* específic per ONT.

**Taula 5. Reactius i condicions de la primera amplificació per PCR del gen ribosomal 16S.**

Solució de reactius		Programa del termociclador		
H <sub>2</sub> O	10,3 µl	<i>Initial denaturation</i>	98°C	30 s
Phusion Buffer HF 5X	4 µl	<i>Denaturation</i>	98°C	15 s
dNTPs (2mM)	2 µl	<i>Annealing</i>	62,5°C	15 s
<i>Primer Fw</i> (10uM)	0,8 µl	<i>Extension</i>	72°C	45 s
<i>Primer Rv</i> (10uM)	1,6 µl	----- 25 cicles -----		
PHUSION HiFi (2U/uL)	0,3 µl	<i>Final Extension</i>	72°C	7 min
ADN	1 µl	<i>Manteniment</i>	15°C	∞

### Segona PCR: amplificació específica i preparació de la llibreria de ONT

Les seqüències de marcatge específic de cada mostra (*barcodes* o índexs) a seqüenciar per la plataforma ONT es van incorporar a les seqüències amplificades mitjançant una segona PCR. El kit comercial PCR Barcoding Kit (Ref. SQK-PBK004, ONT; Oxford, UK) inclou els adaptadors i els índex per a la preparació de la llibreria genètica, juntament amb els reactius necessaris per a carregar la mostra en el dispositiu MinION. El protocol utilitzat per a la indexació i unió d'adaptadors és una adaptació del protocol “*Four-primer PCR (SQK-PSK004 or SQK-PBK004) (versió: FFP\_9038\_v108\_revG\_27 Jun2017)*” compartit a *The Nanopore Community*, una plataforma de col·laboració entre investigadors que utilitzen aquest sistema de seqüenciació per optimitzar protocols i compartir material i metodologies.

Aquesta segona PCR té com a objectiu la unió dels índex específics per a cada mostra i els adaptadors a l'amplicó, gràcies als *tags* ONT incorporats a la primera PCR a través dels seus *primers*; i també la reducció d'ADN d'origen humà per l'amplificació específica dels fragments amb els *tags* ONT. En aquest cas, s'han creat dues rèpliques per preparar la mostra per a les plataformes ONT i Illumina respectivament. Es va preparar una solució barreja de reactius (*Buffer mix*) idèntica per a les dues rèpliques amb la concentració especificada a la Taula 6 sense afegir els *primers* i l'ADN.

La rèplica de la plataforma ONT contenia 7,5 µl del *Buffer mix*, 1,5 µl de solució de *primers* del PCR Barcoding kit i 1 µl d'ADN de la primera PCR diluït en aigua sense nucleases en una proporció 1:10. Els *primers* d'aquest kit comercial estan formats per una seqüència complementària al *tag* específic, un índex únic per mostra que permet construir la llibreria genètica amb múltiples mostres i l'adaptador.

Per la seva part, la rèplica de la plataforma Illumina es va preparar amb 7,5 µl del *Buffer mix*, 1,5 µl de solució de *primers* i 1 µl d'ADN diluït a 1:10. Els



*primers* d'aquesta alíquota han estat dissenyats per incloure només la seqüència complementaria al *tag* específic, de manera que s'amplifica amb el mateix mètode que l'alíquota de ONT però sense indexar.

L'ADN polimerasa utilitzada per aquesta etapa va ser la SequalPrep Long PCR (Thermo Fisher Scientific), un enzim optimitzat per replicar fragments llargs d'ADN amb una bona fiabilitat i eficiència. Es va programar el termociclador per realitzar 20 cicles segons les especificacions mostrades a la Taula 6.

Taula 6. Reactius i condicions de la segona amplificació per PCR del gen ribosomal 16S.

Solució de reactius		Programa del termociclador		
H <sub>2</sub> O	4,67 µl	<i>Initial denaturation</i>	94°C	60 s
SequalPrep Buffer 10X	1 µl	<i>Denaturation</i>	94°C	30 s
DMSO 5,5%	0,55 µl	<i>Annealing</i>	62°C	30 s
Enhancer 10X	1 µl	<i>Extension</i>	65°C	75 s
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,1 µl	----- 20 cicles -----		
SequalPrep polimerasa	0,18 µl	<i>Final Extension</i>	65°C	5 min
Mix <i>primers</i> Fw + Rv*	1,5 µl	<i>Manteniment</i>	4°C	∞
ADN (dil 1:10)*	1 µl			

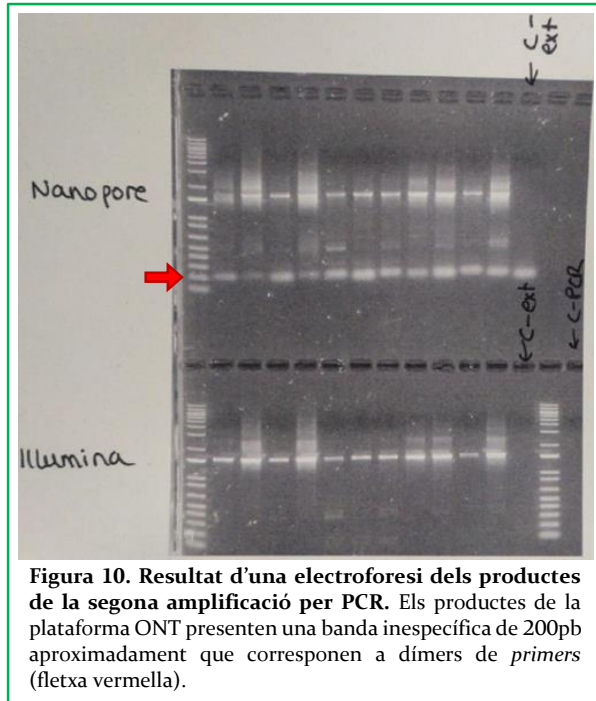
\*afegits a posteriori amb els reactius específics segons cada plataforma de seqüenciació

Els productes finals d'aquesta segona PCR van presentar una concentració d'ADN bacterià suficient per al procés de seqüenciació i, donat que aquest cop es va diluir el producte de la primera PCR i es van utilitzar *primers* específics només per l'ADN amplificat, hi ha una reducció molt substancial d'ADN humà, present ara en menys d'un 1%. Aquest amplificat es pot emmagatzemar a -20°C fins el pròxim pas del protocol.

### Purificació de la rèplica de la plataforma ONT

Tal i com es pot observar en la Figura 10, la rèplica de la plataforma ONT va presentar dímers de *primers* que no s'observaren a l'alíquota de Illumina. Per purificar l'amplificat i descartar totes aquelles molècules que podrien interferir en la seqüenciació i l'anàlisi, es va realitzar el següent protocol amb el kit Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter Inc; CA, USA).

L'ampolla amb la solució que conté els *beads* magnètics es va col·locar en una plataforma



agitadora per resuspendre el contingut. Es va transferir tot el producte de la segona PCR corresponent a la plataforma ONT a un tub de microcentrífuga de 1,5 ml i es va afegir la meitat del volum de la mostra en solució de *beads* (1 µl de solució de *beads* per cada 2 µl de mostra), barrejant per pipeteig. Es va incubar en agitació durant 5 minuts a temperatura ambient per promoure la unió dels *beads* a l'ADN. Aquestes microesferes s'uneixen només a les molècules d'ADN superiors a 100 parells de bases. Mentrestant cal preparar en el moment 500 µl d'una solució d'etanol al 70% en aigua sense nucleases.

Un cop passats els 5 minuts d'incubació, es va centrifugar breument el tub i es va col·locar en el dispositiu MagnaRack (Termo Fisher Scientific) que disposa d'imants que atrauen els *beads* magnètics. Quan el pellet de color marró corresponent a l'ADN i els *beads* es van agrupar al costat de l'imant i

el líquid va quedar transparent, mantenint el tub en contacte amb l'imant, es va retirar el sobrenedant amb una micropipeta. A continuació es van rentar els *beads* amb 200 µl d'etanol al 70% introduint el líquid per la paret contrària al pellet per no separar-lo del imant. Es va retirar l'etanol amb una micropipeta, es va descartar i es va repetir el pas de rentat. Un cop retirat l'etanol del segon rentat, es va centrifugar breument el tub de la mostra i es va tornar a col·locar en el MagnaRack. Es va retirar amb una micropipeta l'etanol residual i es va deixar evaporar el que quedava durant 2 minuts. Després d'aquest pas, els dímers d'ADN ja han estat retirats i en el tub només queda l'ADN amplificat.

Per tal de resuspendre l'ADN i separar-lo dels *beads* magnètics, es va retirar el tub del MagnaRack i es va resuspendre el pellet en 10 µl de Tris-HCl a 10 mM suplementat amb NaCl a 50 mM i ajustat a pH 8.0. El pellet es va trencar amb moviments bruscos de succió amb la micropipeta i rasant la paret del tub amb la punta de la mateixa. Un cop resuspès es va incubar durant 5 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, els *beads* ja es troben separats de l'ADN i van poder ser retirats. Es va col·locar el tub de nou en el MagnaRack i es va esperar uns segons fins que el líquid es va quedar transparent i tots els *beads* a prop de l'imant. Aleshores, es va retirar el líquid amb una micropipeta amb compte de no tocar el pellet i es va traspasar a un tub de microcentrífuga.

Finalment es va quantificar la concentració d'ADN utilitzant un fluoròmetre Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), tant dels productes de PCR d'Illumina com dels productes de PCR ja purificats de ONT.

### **3.3.3. Preparació de la llibreria genètica de la plataforma Illumina**

El protocol per la preparació de la llibreria genètica per a la plataforma MiSeq d'Illumina es va automatitzar mitjançant el robot Hamilton Microlab Star M (Hamilton Company, Reno NV, USA) (Figura 11), programat per realitzar de manera massiva els processos de fragmentació aleatòria de l'ADN amplificat,



**Figura 11. Fotografia del robot Hamilton Microlab Star M en funcionament.** Programat per a preparar la llibreria genètica de les mostres a seqüenciar per la plataforma Illumina segons el protocol establert per al kit comercial NGSgo.

l·ligació dels adaptadors específics d'Illumina als extrems dels fragments, aïllament dels fragments de 300 parells de bases i indexació. Els reactius i el protocol que es van utilitzar són els subministrats pel kit comercial NGSgo (GenDX, IL, EEUU).

El robot, propietat del centre col·laborador Banc de Sang i Teixit, és calibrat i certificat de manera regular per una entitat externa a la institució per assegurar la bona qualitat del procediment.

El protocol de preparació de la llibreria s'inicia amb la fragmentació del producte amplificat per PCR de les rèpliques d'Illumina del pas anterior. En una placa de 96 pous es van dispensar 2  $\mu$ l d'ADN amplificat amb 22,25  $\mu$ l d'aigua sense nucleases a cada pou i es va afegir 8,25  $\mu$ l de la barreja de fragmentació detallada a la Taula 7. La placa es va introduir en un termociclador programat amb els paràmetres descrits a la Taula 8. Immediatament després del primer refredament de les mostres, es va afegir a cada pou 9,25  $\mu$ l de la barreja de l·ligació d'adaptadors (Taula 7) i es va deixar continuar el programa del termociclador.

Taula 7. Composició de les barreges de reactius del kit NGSgo.

<b>Barreja de fragmentació</b>	
Components	Volum (µl)
NGSgo-LibrX Fragmentase Buffer	2
NGSgo-LibrX End Prep Buffer	3,25
NGSgo-LibrX Fragmentase Enzyme	1,5
NGSgo-LibrX End Prep Enzyme	1,5
<b>Barreja de Lligació d'adaptadors</b>	
NGSgo-LibrX Ligase Mix	7,5
NGSgo-LibrX Ligation Enhancer	0,5
NGSgo-LibrX Adapter for Illumina (AD-IL)	0,25
Aigua sense nucleases	1
<b>Barreja d'indexació</b>	
NGSgo-LibrX HiFi PCR Mix	12,5
NGSgo-IndX IN-5##-IL	1,25
NGSgo-IndX IN-7##-IL	1,25

Volums necessaris per a una sola mostra. Els reactius s'han de conservar a 4°C durant tot el procediment.

Taula 8. Programa de temperatures del termociclador per a la preparació de llibreries genètiques de la plataforma Illumina. El termociclador es troba incorporat al robot Hamilton Microlab Star M.

Fase	Temperatura (°C)	Temps (min)
Fragmentació i reparació dels extrems lliures	25	20
	70	10
Refredament	15	Aturada fins afegir adaptadors
Lligació d'adaptadors	20	15
Refredament	15	--

A continuació es va realitzar un pas de selecció dels fragments d'ADN de 300 pb mitjançant *beads* magnètics afegint 18,8 µl de solució 0,45X SPRI Beads a cada pou de la placa i incubant-ho durant 5 minuts a temperatura ambient i en agitació a 1500 rpm. Després d'una breu centrifugació, es va col·locar en la base magnètica per separar els *beads* del sobrenedant. Es va descartar el sobrenedant i es van fer 3 rentats en etanol al 80% durant 30 segons, deixant evaporar l'últim rentat durant 3-5 min. Finalment es va retirar la placa de mostres de la base magnètica, es van afegir 12,5 µl de *buffer* d'elució barrejant bé durant 2 min per diluir el pellet, es va tornar a col·locar a la base magnètica i es van recollir 10 µl del sobrenedant net de *beads*.

A l'etapa d'indexació, es va preparar una nova placa de pous on es van dispensar 15 µl de barreja d'indexació (Taula 7) a cada pou amb un índex diferent per a cada mostra i es van transferir els 10 µl de solució de fragments d'ADN seleccionats al pas anterior. Finalment es va col·locar de nou al termociclador per realitzar 10 cicles amb el programa descrit a la Taula 9.

Taula 9. Programa del termociclador per a la indexació de mostres de la plataforma Illumina

Programa del termociclador		
<i>Initial denaturation</i>	98°C	30 s
<i>Denaturation</i>	98°C	10 s
<i>Annealing</i>	65°C	30 s
<i>Extension</i>	72°C	30 s
----- 10 cicles -----		
<i>Final Extension</i>	72°C	5 min
<i>Manteniment</i>	15°C	∞

Un cop acabat el programa de temperatures, es va repetir l'etapa de selecció de fragments d'ADN anterior però amb 15 µl de 0,6X SPRI Beads sobre el material genètic indexat. Un cop netejat, es van combinar 5 µl de cada llibreria en un únic tub amb un volum total d'uns 50 µl i es va quantificar la concentració d'ADN utilitzant un fluoròmetre Qubit.

### 3.3.4. Seqüenciació de les mostres

Un cop les mostres ja han estat amplificades i s'han preparat les llibreries genètiques, s'han de carregar en els dispositius encarregats de realitzar la seqüenciació. A continuació s'explica el protocol utilitzat per a cada una de les plataformes de seqüenciació per separat.

#### Introducció de les mostres al dispositiu MiSeq de Illumina

La llibreria genètica preparada amb els adaptadors i índex d'Illumina es va diluir en aigua sense nucleases a una concentració de 4nM. Es van transferir 5 µl de la llibreria d'ADN en un tub juntament amb 5 µl de NaOH a 0,2M i es va deixar incubar durant 5 minuts a temperatura ambient per desnaturalitzar la doble cadena d'ADN. Es va aturar la reacció afegint 990 µl de Pre-chilled HT-1 Buffer en gel i es van dispensar 600 µl de llibreria en un cartutx de reactius de MiSeq de 300 cicles, el qual permet fer lectures de 150 bases *forward* i *reverse*, arribant a *paired-end reads* de 300pb. Finalment es va introduir el cartutx al dispositiu MiSeq (Figura 12) i es va iniciar el protocol de seqüenciació d'acord amb les instruccions del fabricant.



Figura 12. Seqüenciador MiSeq d'Illumina

#### Introducció de les mostres al dispositiu MinION de ONT

Les mostres a seqüenciar pel procediment ONT han de ser preparades prèviament per incorporar els adaptadors necessaris per al bon funcionament de la metodologia de seqüenciació. Els reactius que es requereixen es troben en el PCR Barcoding kit que es fa servir en l'etapa d'amplificació i preparació de la llibreria genètica.

El primer pas va ser incorporar els Rapid 1D Sequencing Adapters (RAP) als extrems de les mostres amplificades. El RAP és un oligonucleòtid reconegut per la proteïna encarregada d'introduir l'amplicó a l'interior dels porus de la *flow cell*. Les seqüències *barcode* introduïdes durant la segona PCR presenten uns adaptadors als seus extrems 5' que faciliten la unió del RAP sense necessitat de lligases, per complementaritat. Així, es van diluir en aigua sense nucleases totes les mostres per ajustar-les a la mateixa concentració d'ADN i es va transferir el mateix volum a un mateix tub de microcentrifuga. Es va afegir 1 µl de solució RAP per cada 10 µl de llibreria, es va barrejar suaument i es va centrifugar breument per assegurar que tot el líquid caigués al fons del tub. Es va deixar incubar la mostra durant 5 minuts a temperatura ambient per deixar que els adaptadors s'unissin a les cadenes d'ADN. Passat aquest temps es va introduir en gel a 2-8°C fins la càrrega en el dispositiu MinION.

El segon pas va consistir en preparar la *flow cell* del MinION per ser carregada. Prèviament es van descongelar les solucions Sequencing Buffer (SQB), Loading Beads (LB), Flush Tether (FLT) i un tub de Flush Buffer (FLB) a temperatura ambient i, un cop líquides, es van col·locar en un recipient amb gel a 2-8°C. Es van barrejar amb vòrtex els tubs SQB i FLB, es van centrifugar breument i es van tornar al gel. Va centrifugar-se breument el tub FLT i es va barrejar per pipeteix abans de retornar-lo al gel. El FLT és una molècula que ajuda a dirigir l'ADN a la membrana on es troben els porus, augmentant així la concentració d'ADN al voltant dels porus de seqüenciació. Els *buffers* SQB i FLB contenen ions que generen el flux elèctric i ATP per a fer funcionar la proteïna motora dels porus, entre altres metabòlits necessaris per a la reacció.

A continuació, es va introduir una *flow cell* en el port del MinION (Figura 13) i es va obrir el Priming port desplaçant la tapa en sentit horari fins que el forat es va fer visible (Figura 14). Es va comprovar la presència d'una petita bombolla just per sota del port i es va retirar seguint els següents passos. Es va agafar una pipeta P1000 i es va configurar a 200 µl. Es va introduir la punta



en vertical en el Priming port i es va fer girar la rodeta de la pipeta fins que va marcar 220-230  $\mu\text{l}$  o es va començar a veure el líquid entrar en la punta. Cal extremar la precaució en aquest punt ja que aspirar més de 20-30  $\mu\text{l}$  pot provocar danys en la matriu de porus del dispositiu. Un cop extreta la bombolla, es va preparar el tampó *priming mix* per a la matriu de porus barrejant per



Figura 13. Col·locació d'una *flow cell* en el seqüenciador MinION.

pipeteig 30  $\mu\text{l}$  de FLT directament en el tub FLB. Seguidament, es van introduir 800  $\mu\text{l}$  de *priming mix* dins la *flow cell* a través del Priming port, molt lentament i evitant la formació de bombolles. Finalment, es va deixar reposar durant 5 minuts.

El tercer pas va ser preparar la llibreria i carregar-la en la *flow cell*. En un nou tub, es van transferir 11  $\mu\text{l}$  de la llibreria d'ADN i es van afegir 34  $\mu\text{l}$  de SQB, 25,5  $\mu\text{l}$  de LB i 4,5  $\mu\text{l}$  d'aigua sense nucleases. LB conté una suspensió de

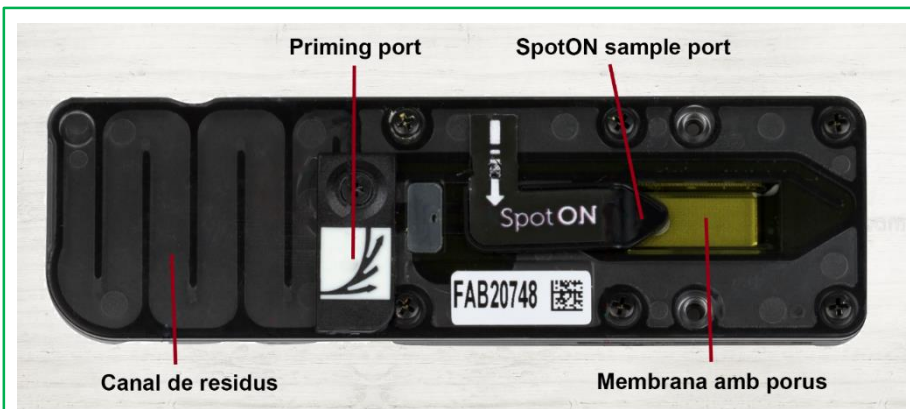


Figura 14. *Flow cell* de la plataforma de seqüenciació de Oxford Nanopore Technologies. S'introdueixen els *buffers* i la mostra a través del SpotON port, els quals van a parar a la membrana amb els porus per a la seqüenciació. Un cop les solucions travessen els porus, el líquid es condueix cap al canal de residus on són rentats per el *priming mix* introduït pel Priming port i posteriorment descartats. Els ports Priming i SpotON sample es troben tancats en la imatge. Adaptada del protocol Four-Primer PCR (SQK-PSK004 or SQK-PBK004).

*beads* que s'uneixen a l'ADN i el fan precipitar cap a la membrana per augmentar encara més la seva concentració al voltant dels porus. Aquests *beads* precipiten ràpidament, pel que és imprescindible barrejar el tub immediatament abans del seu us. Es va obrir el port SpotON sample aixecant la tapa i es van introduir 200 µl de *priming mix* a través del Priming port molt lentament evitant la formació de bombolles i el vessament pel port SpotON sample. Es va barrejar la llibreria per pipeteig i es van introduir 75 µl a través del port SpotON sample deixant caure el líquid gota a gota per la rampa adjacent, procurant que cada gota fluís a l'interior del port abans d'afegir la següent. Finalment, es va tancar suaument el port SpotON sample, el Priming port (Figura 14) i la tapa del MinION i es va activar la seqüenciació des de l'ordinador connectat al dispositiu.

### 3.3.5. Anàlisi bioinformàtica

El sistema informàtic darrere les plataformes de seqüenciació és l'encarregat de realitzar el procés d'assignació de bases nucleiques a partir de senyals de fluorescència en el cas d'Illumina, i a partir dels canvis de corrent elèctrica en el cas de ONT. Aquest procés s'anomena *basecalling*, el resultat del qual són arxius de text en format FASTQ amb la seqüència de cada lectura i la seva informació d'identificació i qualitat. En aquests arxius estan barrejats totes les lectures de totes les mostres incorporades en una càrrega de *flow cell*. Cada plataforma de seqüenciació disposa de programari específic per a realitzar el *basecalling*.

Els arxius “.fastq” van ser demultiplexats abans de ser processats, procediment on s'identifiquen els marcadors *barcoding* de cada lectura i són assignats a una mostra, donant com a resultat un arxíu en format FASTQ per a cada mostra amb totes les seves lectures. També es van eliminar els fragments corresponents als adaptadors, marcadors *barcoding* i encebadors. És en aquest punt on les metodologies d'anàlisi divergeixen per la diferent naturalesa de les dades.

### CAIXA DE CONCEPTES 3: Programari informàtic utilitzat

**CLC Genomics Workbench:** paquet informàtic amb eines per analitzar, comparar i visualitzar dades resultants de la seqüenciació de nova generació (NGS o TGS). (Qiagen).

**BaseSpace – DRAGEN Metagenomics:** programa informàtic de classificació taxonòmica que utilitza l'algoritme Kraken2 juntament amb la seva pròpia base de dades. Elimina automàticament l'ADN humà i integra un conjunt de mètriques de qualitat en l'informe resultant (Wood i Salzberg, 2014; Wood *et al.*, 2019).

**EPI2ME – 16S Workflow:** eina d'identificació taxonòmica de bacteris i arqueus en temps real específicament optimitzada en lectures llargues de la plataforma ONT. Es basa en l'algoritme BLAST d'alineació de seqüència amb la base de dades del NCBI.

**EPI2ME – What's in my Pot? (WIMP):** eina d'anàlisi quantitativa per a la identificació d'espècies de bacteris, fongs, arqueus i virus en temps real. Fa ús de l'algoritme Centrifuge basat en realitzar esquemes d'indexació mitjançant els índex Burrows-Wheeler transform (BWT) i Ferragina-Manzini (FM), optimitzats per a metagenòmica (Kim *et al.*, 2016).

**Expectation-Maximization Iterative Reconstruction of Genes from the Environment (EMIRGE):** eina de reconstrucció de gens ribosòmics de longitud completa a partir de dades de seqüenciació de lectura curta (Miller *et al.*, 2011, 2013).

**FastQC Toolkit:** eina bioinformàtica per a realitzar controls de qualitat de les seqüències resultants d'un procés de seqüenciació (Andrews, 2010).

**Mapping-Assisted Targeted-Assembly for Metagenomics (MATAM):** programa dedicat a l'assemblatge dirigit del gen *16S* ribosomal a partir de lectures curtes de seqüenciació (Pericard *et al.*, 2018).

**Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2):** plataforma bioinformàtica per a l'anàlisi del microbioma. És de codi obert i incorpora com a complements eines informàtiques externes per al processament de seqüències (Bolyen *et al.*, 2019). Disposa d'una comunitat d'usuaris molt activa.

**Reference Sequence annotation and Curation Pipeline (RESRIPT):** eina de processament de bases de dades de seqüències de referència i dades taxonòmiques. Permet compilar, filtrar, modificar, fusionar i avaluar la qualitat d'arxius de seqüències i bases de dades (Robeson *et al.*, 2020).

**Scikit-learn:** eina d'anàlisi de dades predictiva que fa ús de l'aprenentatge artificial per realitzar *clustering*, classificació taxonòmica o models predictius (Pedregosa *et al.*, 2011).

**Vsearch:** eina de processament de seqüències metagenòmiques de codi obert que permet, entre d'altres, filtrar, dereplicar, eliminar quimeres, agrupar OTUs i classificar taxonòmicament (Rognes *et al.*, 2016).

**REAGO 1.1:** programa de reconstrucció del gen *16S* a partir de lectures curtes de dades metagenòmiques en format FASTA (Yuan *et al.*, 2015).

### **3.3.5.1. Posada a punt de l'anàlisi informàtica de la microbiota seminal**

Les dades de seqüenciació extretes de cada plataforma es processen de manera diferent per igualar el format i obtenir resultats comparables entre elles. En el cas de la plataforma Illumina, que no és capaç de generar lectures llargues, la mostra d'ADN va ser fragmentada de manera aleatòria abans de ser carregada al seqüenciador. Les dades resultants són, doncs, un seguit de petits fragments del gen ribosomal *16S* original. En canvi, la plataforma d'Oxford Nanopore Technologies sí que permet lectures de cadenes prou llargues com per seqüenciar de forma íntegra el gen, de manera que les mostres no van rebre cap tractament previ a la seqüenciació. Així, les dades de ONT corresponen a lectures completes del gen *16S*.

En els apartats següents es desenvolupen les diferents anàlisis computacionals que es van explorar per tal d'optimitzar els resultats extrets en cada cas. S'ha partit d'una mostra control amb una comunitat bacteriana coneguda (*mock community*) per observar si els resultats obtinguts a cada mètode alternatiu s'ajusten a les proporcions bacterianes esperades.

#### **3.3.5.1.1. Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma Illumina**

Tal i com s'acaba de comentar, les dades extretes del seqüenciador MiSeq de Illumina corresponen a lectures de fragments de 150 pb aleatòries del gen ribosomal *16S* de tots els bacteris presents a cada mostra. El programari informàtic destinat a analitzar la microbiota a través de la seqüenciació d'amplicó parteix del supòsit que totes les lectures del seqüenciador corresponen al mateix segment, pel que es van haver de dissenyar altres estratègies per adequar-se a la naturalesa dels nostres resultats. Així, es van explorar tres vies diferents: una anàlisi amb *machine learning*, una anàlisi metagenòmica i una anàlisi per reconstrucció d'amplicó.

### 1. Anàlisi amb *machine learning*

Una de les estratègies habituals de classificació taxonòmica de la seqüenciació d'amplicó és l'ús d'un algoritme classificador basat en l'aprenentatge artificial o *machine learning*. Aquests algoritmes s'han d'entrenar amb una base de dades que contingui només informació per a la regió que s'ha seqüenciat, de manera que quan introdueixes posteriorment les dades de la seqüenciació, la classificació és més dirigida. Tot i no disposar de la seqüenciació íntegra de l'amplicó, es va escollir aquesta estratègia per la capacitat d'aprendre del tipus de dades que s'introdueixen i per tenir un gran suport d'usuari amb una comunitat d'investigadors que col·laboren per optimitzar l'anàlisi. En aquest cas es va treballar dins l'entorn del paquet de programari QIIME2, utilitzant l'algoritme Scikit-learn amb la base de dades de SILVA més recent (SILVA SSU 138.1 Ref NR 99).

El flux de treball dissenyat per a aquest anàlisi es va iniciar amb un filtratge dels *reads forward*, descartant els *reads reverse* de l'anàlisi. En la plataforma Illumina, la longitud de les lectures és d'aproximadament 300 pb, però pot variar de 200 a 400 pb. Els cicles utilitzats en aquest experiment van ser de 150 pb per cada extrem, de manera que alguns *reads* no presenten solapament i, per tant, es generarien lectures quimèriques on hi faltaria la regió central del *read*. Per evitar això i perdre el mínim d'informació possible, només es van seleccionar els *reads forward* (QIIME 2 forum, 2017, 2019).

A continuació, es va realitzar un control de qualitat on es van filtrar els *reads* segons tres paràmetres: una longitud de lectura màxima de 150 pb, un Q-Phred de 30 i l'eliminació de seqüències quimèriques produïdes *de novo* mitjançant l'explotació de dades d'abundància amb els complements Quality-filter (Bokulich *et al.*, 2013) i Vsearch. També es van dereplicar les dades amb Vsearch generant una taula amb les abundàncies de cada *read* idèntic per tal d'eliminar duplicitats a l'hora d'analitzar i posteriorment filtrant aquells *reads* amb una abundància de 1, amb una alta probabilitat de ser artefactes de seqüenciació.

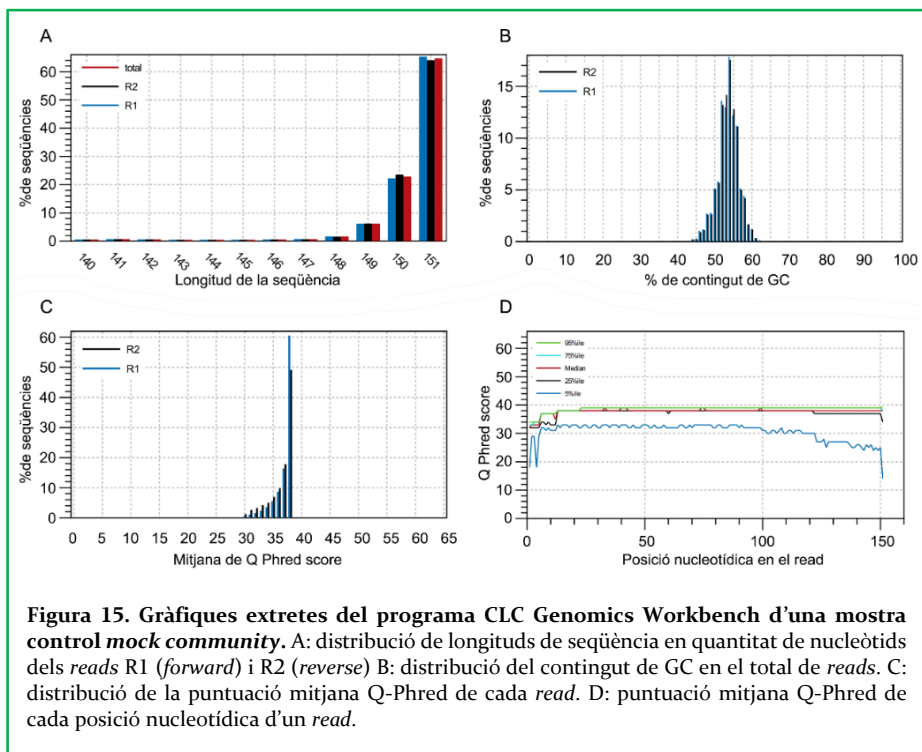
Com a conseqüència de l'amplificació de la seqüència del gen *16S* i el procés de fragmentació posterior, durant la seqüenciació es van generar *reads* en les dues orientacions possibles de la seqüència original. Així, va ser necessari reorientar les lectures abans de realitzar la classificació taxonòmica per a que tots estiguessin en la mateixa orientació. Es va dur a terme mitjançant el complement *Reference Sequence annotation and Curation Pipeline* (RESCRIPt) i la base de dades de SILVA.

Seguidament, es va realitzar una agrupació de seqüències (*clustering*) en unitats taxonòmiques operatives (OTUs) amb referència tancada. Les seqüències es van agrupar amb el complement Vsearch segons un percentatge de similitud del 99% amb la base de dades SILVA, recalculant l'abundància de cada grup amb els valors d'abundància de cada *read* inclòs. Aquelles lectures que no es van trobar a la base de dades van ser descartades. Finalment, amb el complement Scikit-learn, es va classificar cada OTU en un taxó concret segons la seva similitud a la base de dades de SILVA. Es van obtenir informes d'abundàncies relatives de cada bacteri identificat i es van visualitzar a través de la plataforma QIIME2.

## 2. Anàlisi metagenòmica

Una altra de les estratègies d'estudi de la microbiota és la seqüenciació de genoma complet o WGS, on a través de *primers* aleatoris es seqüencia tot l'ADN present en una mostra bacteriana. Amb aquest mètode s'obté un arxiu amb fragments aleatoris de tot el genoma bacterià, quelcom semblant a el nostre cas on es disposa de fragments aleatoris de tot un gen. Per aquest motiu, es va seleccionar un mètode d'anàlisi metagenòmica amb una base de dades del gen ribosòmic *16S* per a l'alternativa de classificació taxonòmica. Aquesta via es va dur a terme dins l'entorn BaseSpace d'Illumina, utilitzant el programari DRAGEN Metagenomics i la base de dades Extended Kraken2 (Març 2020) integrada en el mateix.

El flux de treball dissenyat va començar amb el pre-processament i control de qualitat de tots els *reads* obtinguts mitjançant els *softwares* CLC Genomics Workbench i FastQC Toolkit, utilitzant els mateixos paràmetres d'exclusió que en l'estratègia anterior. Aquests programes informàtics permeten observar paràmetres de seqüència com la longitud i cobertura dels *reads* o la presència de seqüències duplicades; i paràmetres de bases com el contingut en Guanina-Citosina (GC), el número de bases ambigües detectades o el Q-Phred (Figura 15).



A continuació es van introduir totes les dades en el programa DRAGEN Metagenomics i l'informe resultant va ser exportat en format "valors separats per tabulacions" (TSV) i editat amb un *script* (seqüència de comandes) propi per obtenir les abundàncies relatives de cada espècie bacteriana identificada. Els resultats van ser visualitzats amb un programa d'edició de fulls de càlcul.

### 3. Anàlisi per reconstrucció d'amplicó

Donat que molts dels programes informàtics de processament de dades de microbiota estan dissenyats per a amplicons complets, es va explorar la possibilitat de reconstruir l'amplicó a partir dels fragments curts generats a les lectures per tal de, posteriorment, analitzar l'amplicó del *16S* complet amb les estratègies més habituals.

Existeixen diferents solucions informàtiques enfocades a la reconstrucció de gens però, per la seva idoneïtat respecte a les lectures obtingudes i la seva optimització per al gen *16S*, es van utilitzar els següents tres programes en llenguatge Python: EMIRGE, REAGO 1.1 i MATAM.

EMIRGE i MATAM parteixen de seqüències en format FASTQ mentre REAGO 1.1 només treballa en format FASTA. A grans trets, aquest programari identifica els fragments que pertanyen al gen *16S* en la mostra i els aparella buscant punts de solapament per anar generant els *contigs* finals.

#### **3.3.5.1.2. Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma ONT**

Les dades extretes del seqüenciador MinION d'Oxford Nanopore Technologies corresponen a lectures completes del gen ribosomal *16S* de tots els bacteris presents a cada mostra. Tot i així, la menor profunditat de seqüenciació de la plataforma i la major taxa d'error dels *reads* de ONT respecte d'Illumina, fa que aquestes lectures presentin certes dificultats per ajustar-se als paràmetres estàndards dels programes específics d'anàlisi d'amplicó. Per aquest motiu, es van explorar diferents alternatives d'anàlisi: una anàlisi d'agrupació per OTUs i classificació amb *machine learning*, una anàlisi d'alineació directa i consens de taxonomia i una anàlisi metagenòmica.

##### 1. Anàlisi amb *machine learning*

Disposant de l'amplicó complet, es va optar per un anàlisi semblant a l'utilitzat en la primera alternativa d'Illumina. En aquest cas, l'anàlisi es va



dur a terme dins l'entorn QIIME2 seguint el *pipeline* q2ONT descrit a la plataforma de desenvolupament col·laboratiu GitHub («GitHub - DeniRibicic/q2ONT: Bash pipeline for analysis of ONT full-length 16S sequences in QIIME2», 2020).

El flux de treball es va iniciar amb una concatenació de tots els fitxers “.fastq” en un únic document i el demultiplexat de les lectures amb el programa Porechop. A continuació, amb Trimmomatic es van descartar els *reads* més petits de 1.400 pb i els més llargs van ser seccionats a aquesta longitud. Es van importar les dades a la plataforma QIIME2 on es van dereplicar i es van identificar i eliminar les seqüències quimèriques amb el complement Vsearch.

Un cop processades, les lectures es van agrupar en OTUs amb referència oberta mitjançant Vsearch amb un 85% de percentatge de similitud. La selecció d'aquest percentatge més baix, en contraposició a l'estratègia escollida per les dades de la plataforma d'Illumina, és degut a la alta taxa d'error de la plataforma d'ONT. Les lectures que no es van trobar a la base de dades van ser agrupades *de novo* per a no ser descartades.

Finalment, els *reads* van ser alineats per emmascarar les parts no solapants, es van crear arbres filogenètics amb els OTUs i es van classificar taxonòmicament amb algorismes de *machine learning* del paquet informàtic de python Scikit-learn i la base de dades de SILVA compatible amb el *pipeline* (SILVA SSU 132 Ref NR 99).

## 2. Anàlisi amb consens de taxonomia basat en alineació

Per evitar possibles biaixos d'assignació taxonòmica durant el *clustering*, es va incorporar un anàlisi sense agrupació de *reads* en OTUs, amb una assignació de taxonomia basada en l'alineament directe de cada lectura amb la base de dades. Es va dur a terme dins l'entorn QIIME2 seguint el *pipeline* MetONTIIME (Maestri *et al.*, 2019; Maestri, 2021).

El flux de treball es va obrir amb una concatenació de tots els fitxers FASTQ de cada mostra, els quals van ser dereplicats amb el complement Vsearch. Donat que l'entorn QIIME2 requereix un pas de *clustering* per poder formatjar les dades per a ser classificades, es va procedir a realitzar una agrupació *de novo* amb un percentatge d'identitat del 100%, assegurant així que cada lectura roman intacta i no es substitueix per una seqüència consens. A continuació, es va procedir a la classificació taxonòmica mitjançant alineació directa amb la base de dades més recent del NCBI amb el complement Vsearch.

### 3. Anàlisi metagenòmica

La plataforma EPI2ME és l'entorn d'anàlisi bioinformàtica online que ofereix ONT per processar específicament les dades obtingudes amb la seva plataforma de seqüenciació. Entre el programari facilitat s'inclou una eina específica d'anàlisi quantitatiu enfocada per a dades de metagenòmica per a la identificació d'espècies de bacteris, fongs, arqueus i virus anomenada "What's in my Pot?" (WIMP). A la mateixa vegada, també s'ofereix EPI2ME 16S Workflow, un *software* alternatiu basat en la alineació exclusiva d'amplicons del gen *16S* a través de l'algoritme BLAST. Donades les característiques concretes de les lectures de ONT, es va realitzar l'anàlisi amb aquests dos programes per estar dissenyats específicament per a aquest tipus de lectures. Els programes utilitzen la base de dades més recent del NCBI com a seqüències de referència.

En aquest cas, el flux de treball va consistir en carregar en el núvol informàtic els arxius demultiplexats i executar un projecte WIMP i un 16S Workflow que es computen de forma remota i ofereixen un informe de resultats que es pot exportar en un arxiu en format CSV. Aquest arxiu exportat va ser processat amb un *script* propi per a obtenir les abundàncies relatives de cada categoria taxonòmica.

### 3.3.6. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el *software* IBM SPSS Statistics 22 (International Business Machines Corporation, IBM, Armonk, NY, EUA). Totes les variables van passar un estudi descriptiu i unes proves de normalitat amb els test de Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov segons la mida mostral. Les variables amb distribució normal van ser analitzades entre elles mitjançant tests paramètrics i, en la resta de casos, es van utilitzar tests no paramètrics.

Els estudis de correlació entre variables quantitatives van ser realitzats amb el test paramètric de correlació de Pearson i el no paramètric de Spearman, segons correspon. Els estudis comparatius entre grups es van dur a terme mitjançant la prova U de Mann-Whitney i una prova T-student per a mostres aparellades en el cas de l'anàlisi de variabilitat de l'aparell MiOXSYS. També es van realitzar test de chi-quadrat per valorar el grau d'ajust dels resultats de seqüenciació de les rèpliques de la *mock community* amb les dades teòriques esperades.

## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**



## **BLOC 1: ESTUDI DE PARÀMETRES SEMINALS I ESPERMÀTICS**

Aquest primer bloc de coneixement s'ha centrat en ampliar la informació sobre la relació del ORP amb diferents paràmetres seminals i d'integritat de l'ADN espermàtic en pacients amb infertilitat idiopàtica. Els resultats obtinguts van derivar en la publicació d'un article, adjuntat a l'annex 3 (Garcia-Segura *et al.*, 2020).

### **4.1. Objectiu 1: Posada a punt i valoració del sistema MiOXSYS**

Amb l'objectiu d'obtenir un valor fiable del ORP, es van realitzar dues mesures consecutives de cadascuna de les mostres seminals en l'aparell MiOXSYS conservant les mateixes condicions. Tal i com especifica el fabricant, el dispositiu va mostrar valors en rangs similars i totes dues mesures observades presenten una forta correlació entre elles (Taula 10). No obstant això, una anàlisi T-student per mostres aparellades ha revelat diferències significatives entre les dues mesures (Taula 10). Per aquest motiu es va decidir estudiar els paràmetres seminals i espermàtics que poguessin estar relacionats amb aquestes variacions, representades com la resta entre la primera i segona mesura de ORP en valors absoluts. Cap dels paràmetres valorats en aquest estudi ha presentat correlació significativa amb aquestes diferències, malgrat sí s'ha observat que les mostres amb diferències més grans entre les dues mesures (variacions superiors a 10 mV) també presenten un pH del plasma seminal major a 8.0 (Figura 16).

Treballs publicats sobre l'efectivitat de l'aparell MiOXSYS han identificat la influència de la viscositat seminal sobre les lectures com el seu principal desavantatge (Agarwal i Bui, 2019; Rana i Agarwal, 2020). De fet, en aquest estudi s'han exclòs cinc mostres que no van poder ser mesurades degut a la seva alta viscositat. De la resta de mostres analitzades es van obtenir resultats estables, reproduïbles i fiables per a cada individu, tant en mostres fresques com criopreservades.

Taula 10. Estadística descriptiva de la primera (potencial oxidant-reductor estàtic 1; sORP1) i la segona mesura (sORP2) de cada mostra al dispositiu MiOXSYS i estudi de relació entre elles.

Mesures	Mitjana $\pm$ desv. estàndar	Interval de confiança (95%)
sORP1 (n = 37)	57.01 $\pm$ 27.32	47.90–66.12
sORP2 (n = 32)	55.71 $\pm$ 25.84	46.39–65.02
Tests estadístics	Valor estadístic	p-valor
Correlació de Pearson (sORP1 vs sORP2)	r = 0.853	< 0.001
T-student per mostres aparellades (sORP1 vs sORP2)	t = 2.306	0.028

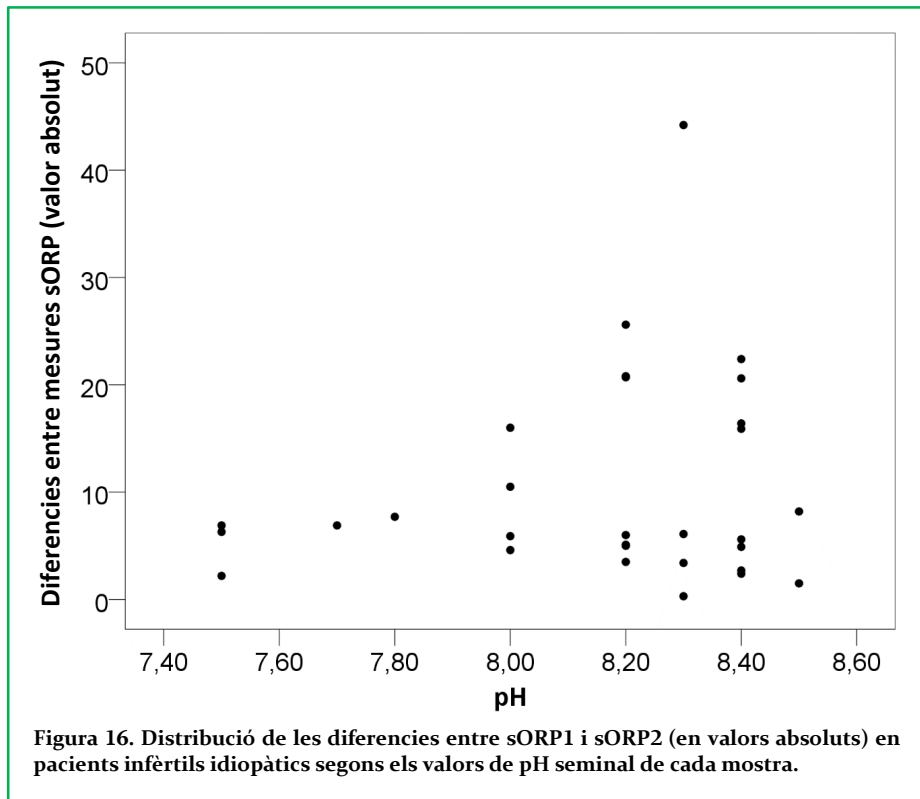


Figura 16. Distribució de les diferències entre sORP1 i sORP2 (en valors absoluts) en pacients infèrtils idiopàtics segons els valors de pH seminal de cada mostra.

Aquests resultats suggereixen que, a més de la viscositat, altres paràmetres seminals podrien estar influïent en el resultat de la lectura. Així, per exemple, com més bàsic (o alcalí) és el pH seminal, major és el número de mostres amb diferències significatives entre les dues mesures (Figura 16).

El sistema MiOXSYS és un mètode electroquímic que avalua el flux d'electrons a través d'un sensor galvanostàtic. Per tant, és possible que canvis en el número de protons presents en el plasma seminal afectin al resultat de la lectura. En general, qualsevol solució aquosa augmenta la seva conductivitat elèctrica com més ions conté (Shackelford *et al.*, 1999; Leveling, 2002; Ouhadi i Goodarzi, 2007). Així, els valors baixos o alts de pH augmenten la conductivitat elèctrica respecte a un pH neutre, possiblement alterant les mesures de potencial elèctric d'una mostra. Segons aquest raonament, la reproductibilitat de les mesures de sORP es veu afectada en mostres amb valors de pH alcalí per sobre de 8. A partir d'aquest valor es poden trobar diferències de més de 10 mV entre les dues mesures analitzades, arribant fins a 44 mV en un dels casos (Figura 16).

És necessari realitzar investigacions addicionals augmentant el número mostral i la quantitat de mesures realitzades a cada mostra per determinar el grau d'influència del pH seminal en la reproductibilitat del sistema MiOXSYS. En cas que es confirmés l'efecte del pH sobre les mesures, es farà necessària la inclusió del valor del pH en l'algoritme de normalització del sistema, juntament amb la concentració espermàtica i la viscositat seminal.



#### **4.2. Objectiu 2: Relació entre els biomarcadors d'infertilitat masculina**

Les característiques de motilitat, morfologia i concentració espermàtiques així com els atributs del plasma seminal de volum, pH i viscositat es van recollir per a totes les mostres juntament amb els biomarcadors d'estrès oxidatiu (sORP), fragmentació de l'ADN i estat de compactació de la cromatina espermàtica. La distribució de tots els paràmetres es detalla a la Taula 11.

Els valors obtinguts per l'aparell MiOXSYS han estat normalitzats per la concentració espermàtica (nsORP-C), tal i com indica el protocol del fabricant. Això és necessari perquè la quantitat d'espermatozoides a la mostra pot influir en el flux d'electrons a través del líquid. Tal i com s'ha comentat en els resultats i discussió de l'objectiu 1, altres paràmetres poden afectar la precisió de la mesura del sistema MiOXSYS. Entre ells destaquen la viscositat i el pH seminals. Per aquest motiu i amb l'objectiu de reduir el possible impacte d'aquests paràmetres sobre el ORP, s'han utilitzat dos nous índexs: el sORP normalitzat per la viscositat (nsORP-V) i normalitzat pel pH seminal (nsORP-P).

Els tres índexs de ORP valorats han mostrat correlació negativa amb el percentatge de cèl·lules CMA3 positives, especialment nsORP-V. A més, nsORP-C i nsORP-P també han correlacionat de forma positiva amb el volum seminal i de forma negativa amb la viscositat. Respecte a nsORP-V, s'ha trobat una correlació negativa amb el pH seminal i, més significativament, amb la motilitat total i la progressiva; aquesta última també correlacionada amb nsORP-P, tot i que amb menor intensitat (Taula 12).

Aquests resultats de correlació semblen reforçar els resultats descrits en l'objectiu 1, ja que s'observen correlacions negatives significatives entre els índex de sORP, la viscositat i el pH.

Taula 11. Distribució dels paràmetres seminals de les mostres de pacients idiopàtics

Paràmetres seminals i espermàtics	Mitjana ± desviació estàndard	Interval de confiança (95%)
nsORP-C (mV/10 <sup>6</sup> sperm/mL)	3.02 ± 9.50	-0.35–6.39
nsORP-V (mV/cps)	9.84 ± 6.33	7.66–12.02
nsORP-P (mV/U pH)	7.05 ± 3.52	5.86–8.24
TUNEL (%)	42.23 ± 14.98	37.37–47.09
Comet alcalí (%)	34.33 ± 15.07	29.64–39.03
OTM comet alcalí	0.82 ± 0.23	0.75–0.90
Comet neutre (%)	66.17 ± 15.63	61.3–71.04
OTM comet neutre	0.62 ± 0.16	0.57–0.68
CMA3 (%)	38.06 ± 16.51	32.78–43.34
Viscositat (cps)	9.13 ± 13.34	4.80–13.45
pH	8.13 ± 0.39	8.01–8.26
Concentració espermàtica (10 <sup>6</sup> sperm/ml)	68.14 ± 57.49	48.97–87.30
Motilitat total (%)	58.85 ± 16.50	53.35–64.35
Motilitat progressiva (%)	46.69 ± 19.03	40.35–53.04
Morfologia normal (%)	11.36 ± 12.74	6.42–16.30
Volum seminal (mL)	3.00 ± 1.46	2.53–3.46

nsORP-C: ORP normalitzat per la concentració espermàtica; nsORP-V: ORP normalitzat per la viscositat seminal; nsORP-P: ORP normalitzat pel pH; CMA3: test de cromomicina A3; OTM: Olive tail moment.

## Microbiota seminal i Integritat de l'ADN espermàtic

**Taula 12. Anàlisi de correlació dels índex sORP amb els paràmetres seminals i espermàtics** mitjançant tests de correlació de Pearson ( $r$ ) i Spearman ( $\rho$ ) segons correspon. Confirmació amb una estimació curvilínia inversa ( $r^2$ ) en el cas requerit.

Paràmetres seminals i espermàtics	nsORP-C	nsORP-V	nsORP-P
<b>TUNEL</b>	$\rho = 0.160$	$\rho = 0.173$	$\rho = 0.213$
<b>Comet alcali</b>	$\rho = 0.125$	$r = -0.005$	$r = 0.061$
<b>OTM Comet alcalí</b>	$\rho = -0.039$	$r = -0.252$	$r = 0.125$
<b>Comet neutre</b>	$\rho = -0.249$	$r = 0.036$	$r = -0.054$
<b>OTM Comet neutre</b>	$\rho = 0.129$	$\rho = 0.338$	$\rho = -0.028$
<b>CMA3<sup>+</sup></b>	$\rho = -0.394^*$	$\rho = -0.545^{**}$	$\rho = -0.337^*$
<b>Viscositat seminal</b>	$\rho = -0.009$ $r^2 = 0.138^*$	—	$\rho = -0.416^*$
<b>pH seminal</b>	$\rho = -0.002$	$\rho = -0.347^*$	—
<b>Concentració espermàtica</b>	—	$\rho = 0.089$	$\rho = 0.081$
<b>Motilitat total</b>	$\rho = -0.198$	$r = -0.477^{**}$	$r = -0.355^*$
<b>Motilitat progressiva</b>	$\rho = 0.125$	$r = -0.485^{**}$	$r = -0.445^*$
<b>Morfologia normal</b>	$\rho = -0.138$	$\rho = -0.005$	$\rho = 0.163$
<b>Volum seminal</b>	$\rho = 0.452^{**}$	$r = -0.058$	$r = 0.342^*$

\*  $p$ -valor  $< 0.05$ ; \*\*  $p$ -valor  $< 0.01$ .

En relació amb la integritat de l'ADN espermàtic, tant la SDF com l'estat de compactació de la cromatina han estat valorats envers els altres paràmetres seminals i espermàtics recollits a l'estudi. Els trencaments d'ADN de cadena simple, valorats per l'assaig Comet alcalí, han mostrat una forta correlació negativa amb la motilitat total i la progressiva, tant en el cas del percentatge de cèl·lules amb SDF com de forma computacional amb el paràmetre OTM (Taula 13). La morfologia i la concentració espermàtiques també presenten una tendència correlativa amb aquest tipus de trencaments, però sense significança estadística (Taula 13).

**Taula 13. Anàlisi de correlació dels paràmetres de fragmentació d'ADN espermàtic (SDF) i del test de cromomicina A3 (CMA3) amb els paràmetres seminals i espermàtics mitjançant test de correlació de Pearson (r) i Spearman ( $\rho$ ) segons correspon.**

Paràmetres	TUNEL	Comet alcalí	OTM alcalí	Comet neutre	OTM neutre	CMA3
<b>CMA3<sup>+</sup></b>	0.338*	0.346*	-0.043	-0.043	-0.230	—
<b>Viscositat</b>	-0.125	0.321*	0.390*	-0.083	-0.463**	0.202
<b>pH</b>	0.166	-0.165	-0.229	0.004	-0.018	0.395**
<b>Concentració espermàtica</b>	-0.048	-0.214	-0.106	0.210	-0.197	0.242
<b>Motilitat total</b>	-0.037	-0.363*	-0.372*	0.022	-0.016	-0.024
<b>Motilitat progressiva</b>	-0.384*	-0.417**	-0.349*	-0.059	-0.175	-0.391*
<b>Morfologia normal</b>	0.010	0.080	0.215	-0.161	-0.228	0.099
<b>Volum seminal</b>	-0.006	-0.147	0.108	-0.300	-0.230	-0.363*

OTM: Olive tail moment; CMA3: test de cromomicina A3.

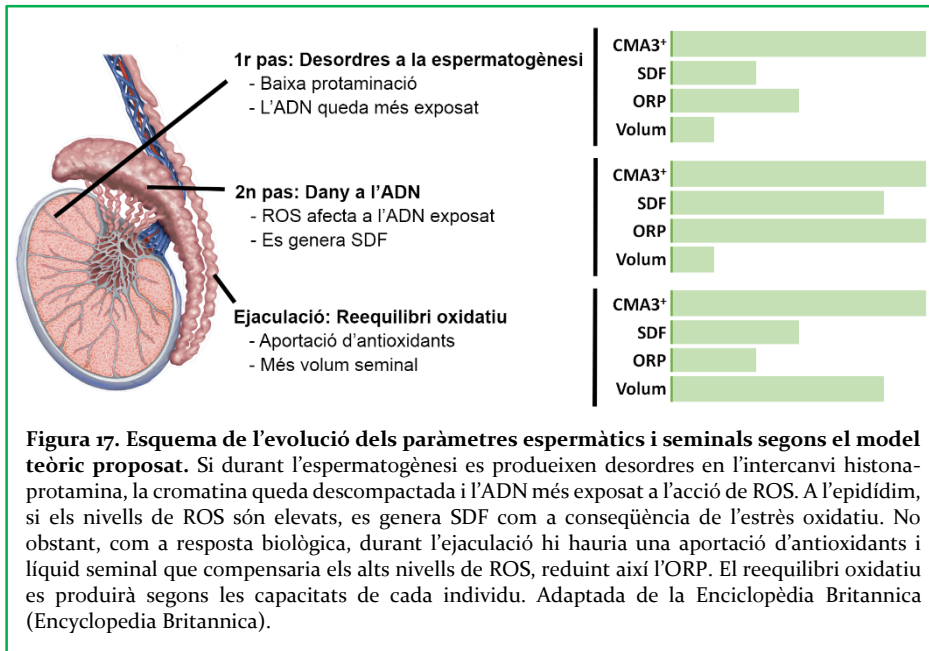
El recompte de cèl·lules amb SDF analitzades tant per l'assaig Comet alcalí com per TUNEL correlaciona positivament amb el recompte de cèl·lules positives per CMA3, excepte en el cas de 5 pacients que presenten fragmentació d'ADN de cadena simple tot i tenir una bona compactació de la cromatina (poques cèl·lules CMA3 positives) (Taula 13). El nombre de positius per CMA3 també ha exhibit una correlació positiva amb el pH seminal i una correlació negativa amb la motilitat progressiva i el volum seminal (Taula 13). Els trencaments d'ADN de cadena doble valorats per l'assaig Comet neutre no han correlacionat amb cap dels paràmetres analitzats a l'estudi.

Diversos autors han descrit una correlació negativa entre el sORP i paràmetres com la motilitat, morfologia, concentració espermàtica i volum

seminal (Arafa *et al.*, 2018; Agarwal *et al.*, 2019a; Majzoub *et al.*, 2020). Els nostres resultats presenten coeficients de correlació entre sORP i la motilitat similars als observats en aquests estudis, per a tots tres índexs normalitzats. En el cas de nsORP-C la correlació no assoleix una significació estadística, probablement a causa d'una mida mostral limitada.

Els resultats mostren que la correlació més significativa es dona entre els tres valors de sORP i el percentatge de cèl·lules positives per CMA3 (Taula 12). És a dir, el grau de compactació de la cromatina espermàtica es mostra inversament proporcional a l'ORP, indicant que a major estrès oxidatiu, menor nombre de cèl·lules amb alteracions de compactació de la cromatina. Aquest resultat aparentment contradictori podria explicar-se pel fet que les alteracions en l'intercanvi histona-protamina ocorren durant l'espermioïgenesis en els testicles. D'acord amb la hipòtesi de dos passos proposada per Aitken i De Iulii (Aitken *et al.*, 2009; Aitken i De Iulii, 2010), un defecte en la compactació de l'ADN espermàtic seria el primer pas que permetria un major accés a les ROS, provocant així un dany extensiu a l'ADN (Figura 17). De fet, en consonància amb estudis previs del nostre grup (García-Peiró *et al.*, 2011a; Ribas-Maynou *et al.*, 2020) i amb altres autors (Nili *et al.*, 2009; Atshan *et al.*, 2020), hem observat una correlació entre el nombre d'espermatozoides amb fragmentació de cadena simple (tant per l'assaig TUNEL com per al Comet alcalí) i les alteracions de compactació valorades pel test de CMA3 (Taula 13).

El segon pas d'aquesta hipòtesis es donaria a l'epidídim, on els nivells de ROS es podrien reduir gràcies a un increment de components antioxidants. Aquests antioxidants anirien acompanyats per un increment en el volum seminal durant l'ejaculació, el qual contribuiria també a diluir la concentració de ROS (Figura 17). Els nostres resultats mostren que pacients amb volum seminal elevat tenen valors d'ORP més baixos (Taula 12), donant així suport a aquesta interpretació.



Qualsevol alteració en la contribució antioxidant i de volum seminal mantindria els nivells de ROS alts, generant encara més dany a l'ADN. En canvi, en individus amb nivells basals o lleugerament elevats de ROS testicular però sense alteracions en l'intercanvi histona-protamina, el sistema de regulació de ROS epididimal podria resultar en una aportació menor d'antioxidants al fluid seminal, donant lloc a un ORP comparativament més elevat.

Els resultats dels assaigs TUNEL i Comet alcalí correlacionen negativament amb la motilitat espermàtica i, en el cas de l'anàlisi computacional de l'assaig Comet alcalí, també es veu una tendència no significativa amb la morfologia (Taula 13). L'associació d'aquests dos assaigs amb la qualitat seminal ha estat àmpliament descrita a la bibliografia (Evenson *et al.*, 2002; Zini *et al.*, 2008; Lewis i Simon, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b; Javed *et al.*, 2019).

Segons una anàlisi prèvia del nostre grup (García-Peiró *et al.*, 2011b), la dinàmica de SDF post-ejaculació és molt variable tant en pacients infèrtils

com en individus control. Independentment dels nivells basals, la generació de nous trencaments d'ADN en l'ejaculat és molt diferent en tots els grups estudiats (Gosálvez *et al.*, 2009; Tvrdá *et al.*, 2018). Aquesta dinàmica tan variable podria ser deguda a la variabilitat interindividual observada en el sORP, on els individus amb alts sORP generarien més SDF amb una exposició prolongada al plasma seminal. En aquest sentit, l'anàlisi de l'ORP pot ser útil per programar la gestió del material seminal durant un procés de reproducció assistida o un projecte de recerca, per exemple prioritzant una separació ràpida dels espermatozoides del plasma seminal en mostres d'alt ORP per evitar un augment de SDF.

## BLOC 2: MICROBIOTA SEMINAL I RELACIÓ AMB LA FERTILITAT

En aquest bloc de coneixement s'ha profunditzat en l'estudi de la relació entre la microbiota seminal i els paràmetres espermàtics i seminals, tot explorant diferents alternatives d'anàlisi, tant en la seqüenciació com en la posterior anàlisi computacional.

### 4.3. Objectiu 3: Posada a punt de l'anàlisi informàtica de la microbiota seminal

Les diferents alternatives d'anàlisi explorades en aquest projecte han estat valorades segons la similitud dels resultats obtinguts en la classificació taxonòmica i les abundàncies relatives amb la composició real de la mostra control *mock community* (Taula 14).

Taula 14. Composició microbiana de la *mock community* comercial "ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard". Abundàncies relatives teòriques calculades segons el número de còpies del gen *16S* presents a cada espècie bacteriana.

Espècies bacterianes	Abundància relativa teòrica (%)
<i>Lactobacillus fermentum</i> [F]	18,4
<i>Bacillus subtilis</i> [F]	17,4
<i>Staphylococcus aureus</i> [F]	15,5
<i>Listeria monocytogenes</i> [F]	14,1
<i>Salmonella enterica</i> [P]	10,4
<i>Escherichia coli</i> [P]	10,1
<i>Enterococcus faecalis</i> [F]	9,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [P]	4,2

\*F = Firmicutes, P = Proteobacteria

Les limitacions tècniques de les plataformes de seqüenciació a l'hora d'obtenir la seqüència exacta de la regió estudiada, fan que sigui necessari assumir una certa taxa d'error. Donat que en espècies molt properes filogenèticament les diferències de seqüència són mínimes, els errors de seqüenciació poden conduir a errors en l'assignació de la seqüència a una



espècie en concret. Això porta a una variació en les abundàncies relatives observades. Si tenim en compte que la seqüència de l'ADN de l'ancestre comú més proper és la més conservada, aquests *reads* queden sovint assignats al taxó LCA (*lowest common ancestor*). Així doncs, s'obté millor resolució d'assignació a mesura que observem taxons més elevats com gènere o família. Per aquest motiu, en aquest treball s'han utilitzat els nivells filogenètics de filum (per màxima resolució), família i gènere (per detallar) per a representar els resultats obtinguts a la classificació taxonòmica.

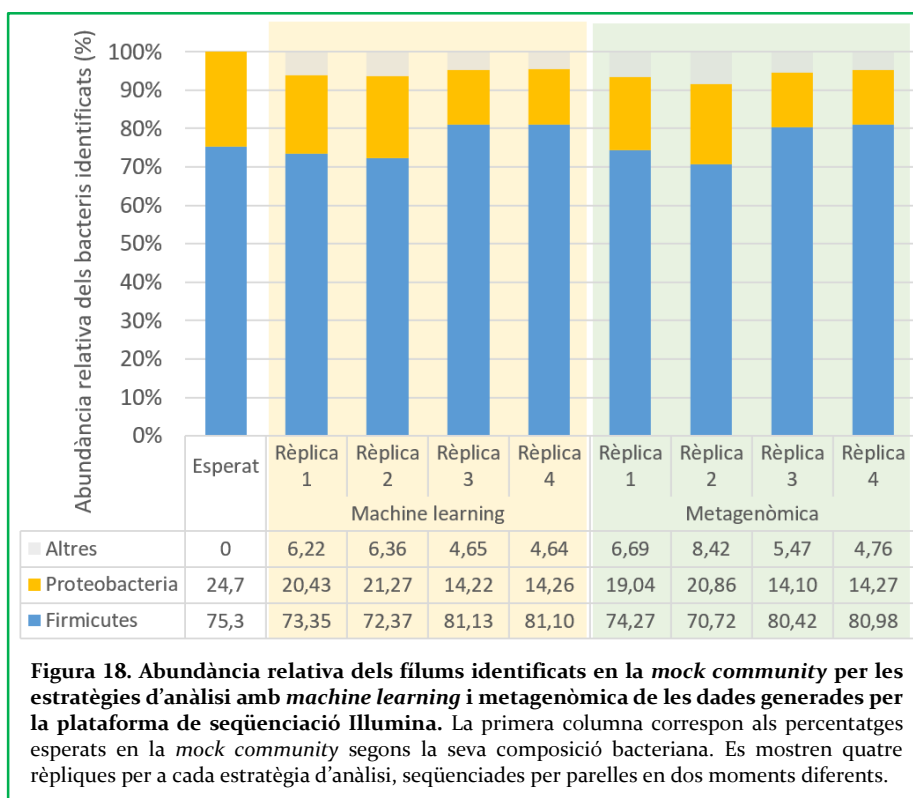
#### **4.3.1. Objectiu 3.1: Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma Illumina**

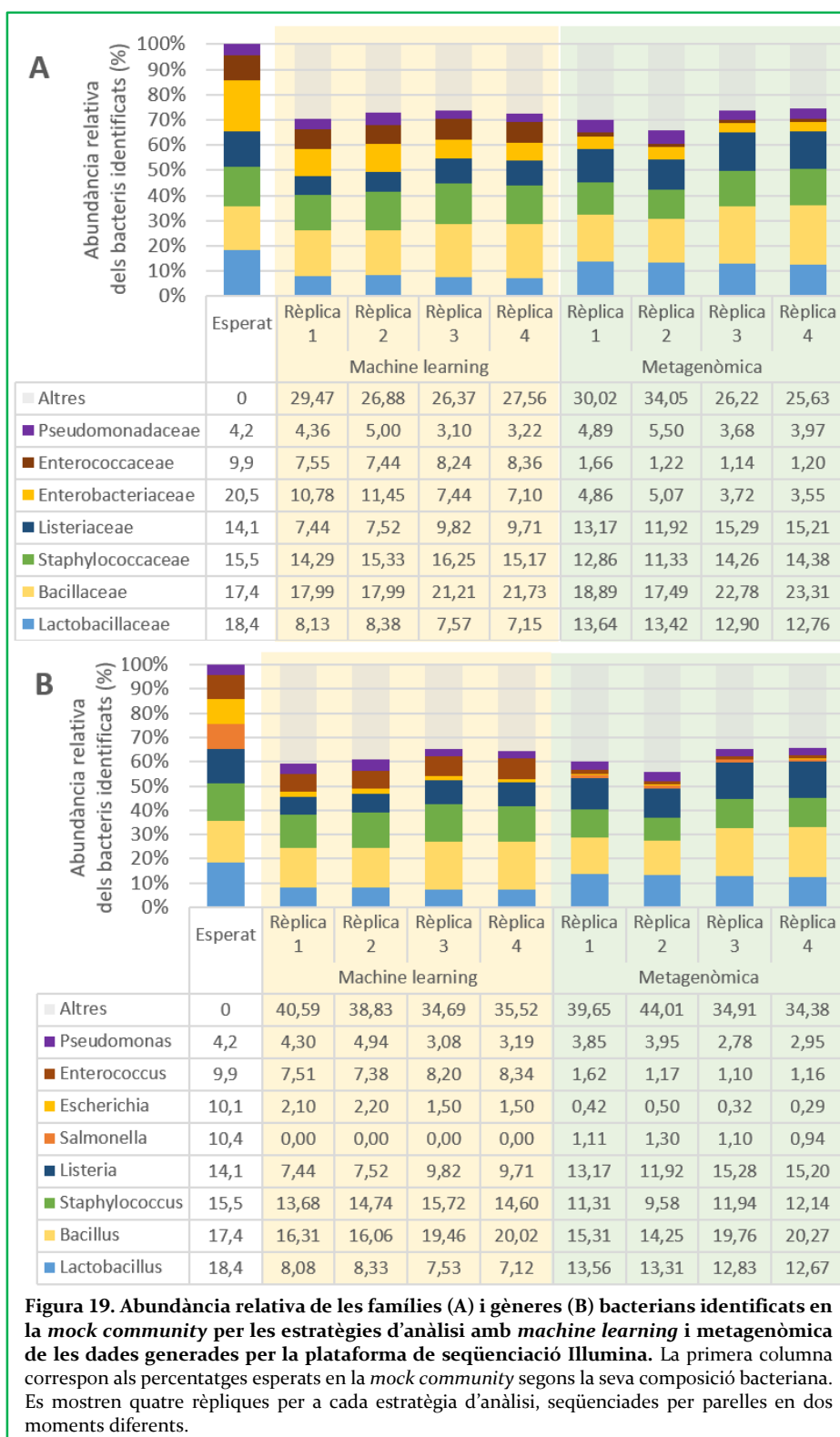
Les estratègies d'anàlisi de *machine learning* i de metagenòmica han identificat correctament els dos filums representats a la *mock community*, amb unes abundàncies relatives molt similars a les esperades (75,3% de *Firmicutes* i 24,7% de *Proteobacteria*). L'estratègia de *machine learning* ha classificat com a *Firmicutes* el 76,99% [72,37 – 81,13] de les lectures i com a *Proteobacteria* el 17,55% [14,22 – 21,27], mentre l'estratègia metagenòmica n'ha classificat el 76,60% [70,72 – 80,98] i el 17,07% [14,10 – 20,86] respectivament (Figura 18).

Respecte a la identificació dels bacteris específics, tots els gèneres han estat correctament descrits amb diferències d'abundància en cada cas, excepte per al gènere *Salmonella*, que no s'ha arribat a identificar per l'estratègia de *machine learning*. Els gèneres *Lactobacillus* i *Listeria* estan millor representats amb l'estratègia metagenòmica amb 13,09% i 13,89% de mitjana respectivament, mentre el *machine learning* ha destacat en la identificació d'*Staphylococcus* i *Enterococcus* amb 14,69% i 7,86% respectivament. *Bacillus* i *Pseudomonas* no presenten diferències importants entre estratègies, amb abundàncies properes als percentatges esperats (Figura 19B). Destaca la baixa detecció d'*Escherichia coli* i *Salmonella enterica*, les quals també queden infrarepresentades a nivell de família

(*Enterobacteria*) i que podrien ser el motiu de la baixa representació de *Proteobacteria* a nivell de filum (Figura 19A). Un test chi-quadrat de bondat d'ajust permet calcular la similitud global de cada alternativa d'anàlisi respecte als valors teòrics esperats. Com més proper a 0 sigui el seu estadístic (la suma de quadrats), més s'ajusten els resultats d'una metodologia a la previsió de la *mock community*. Els nostres resultats mostren que les dues estratègies presenten un ajust similar respecte als valors teòrics esperats, amb uns estadístics de 105,83 per a l'estratègia de *machine learning* i de 114,94 per a la metagenòmica.

Així doncs, les dues estratègies han estat capaces d'identificar correctament els bacteris presents a la *mock community*, el que permet validar el protocol d'extracció, amplificació i seqüenciació que s'ha dut a terme en aquest projecte. Les diferències en les abundàncies relatives responen a les diferents metodologies emprades per comparar les lectures amb la base de dades de





referència i cap d'elles ha destacat de manera general. No obstant, l'estratègia metagenòmica és la que millor identifica el gènere *Lactobacillus*, el qual s'ha descrit amb freqüència en el semen en estudis anteriors (Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020), mentre que les diferències en la resta de gèneres no és elevada. Per aquest motiu, s'ha escollit aquesta estratègia per a la classificació taxonòmica de les mostres seminals, amb l'avantatge addicional de que és l'alternativa amb un processament més ràpid.

Respecte a l'estratègia de reconstrucció del gen *16S* complet a partir dels *reads* curts, cap dels tres programes informàtics ha permès reconstruir de manera satisfactòria els *contigs*. Per a la seqüenciació dels amplicons amb MiSeq d'Illumina es va utilitzar un cartutx de de 300 cicles, el qual permet generar lectures d'aproximadament 150 pb. Així, s'arriba a cobrir fins a 300 pb amb la unió dels *reads forward* i *reverse paired-end*. No obstant, existeix un rang de longituds de lectura per sobre i per sota de 150 pb, de manera que algunes parelles de *reads* no presenten solapament entre elles o el solapament no és suficient com per a unir-se amb garanties de qualitat. Aquest fet podria explicar la dificultat en la reconstrucció del gen complet a partir d'aquestes lectures, ja que s'originen molts *gaps* (espais buits) que dificulten la identificació dels fragments i no permeten la reconstrucció per solapament.

#### **4.3.2. Objectiu 3.2: Estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma ONT**

La posada a punt de l'anàlisi de les dades de la plataforma ONT es va dur a terme amb la seqüenciació de dues rèpliques de la mateixa *mock community*.

Les quatre estratègies d'anàlisi de les dades de la plataforma ONT posen de manifest la importància d'un bon tractament de les dades. Les dues alternatives d'anàlisi metagenòmica que hem emprat en aquest estudi a

través de la plataforma EPI2ME (WIMP i 16S) han identificat correctament els filums corresponents a la *mock community* amb resultats bastant similars. Les abundàncies relatives calculades són superiors a les esperades en el cas dels *Firmicutes* (amb unes mitjanes de 86% i 92,9%) i significativament inferiors en el cas de *Proteobacteria* (amb 10,4% i 6,8%). L'assignació, en aquest cas, és de menys qualitat que la realitzada per a la plataforma Illumina, la qual s'ajusta més als resultats esperats.

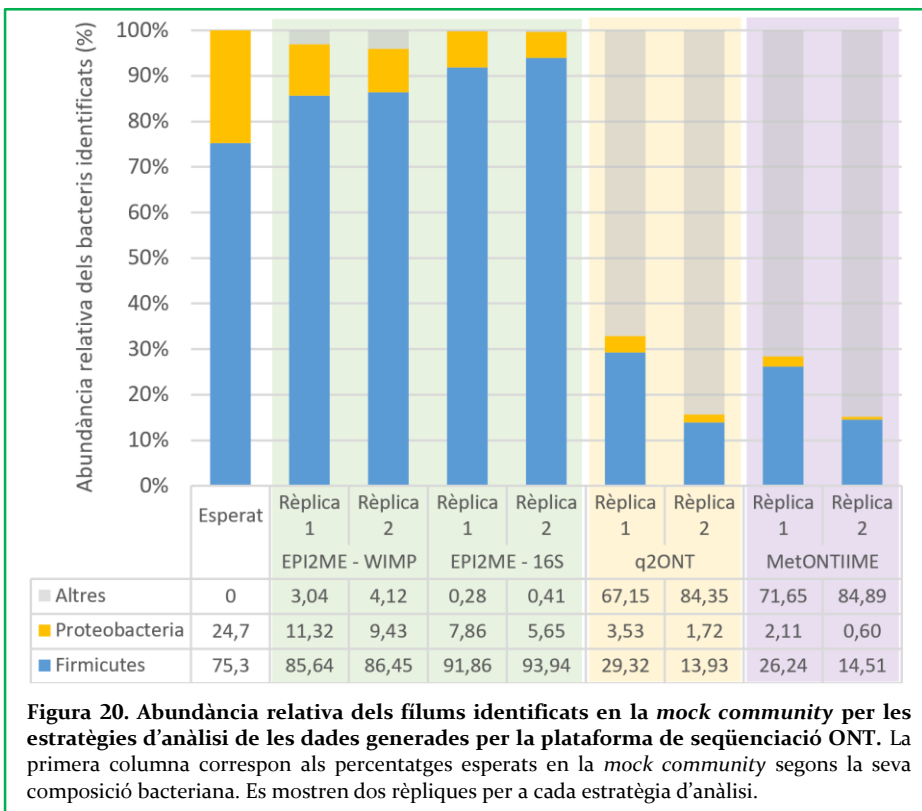
Per una altra banda, malgrat les estratègies amb *machine learning* (q2ONT) i la de consens de taxonomia basat en alineament directe (MetONTIIME) aconseguen identificar els filums *Firmicutes* i *Proteobacteria*, les proporcions obtingudes són molt inferiors a les teòriques de la *mock community* (Figura 20). Això es degut al nombre de lectures no classificades, que en els dos casos supera el 60% de les lectures totals. El motiu de la baixa assignació pot provenir de la metodologia emprada per a agrupar els *reads* en OTUs, pas necessari en els protocols de processament de l'entorn QIIME2. En aquest cas, la taxa d'errors de la plataforma ONT juntament amb la llargada de les lectures faria que les seqüències consens dels OTUs acumulessin molts errors que dificultarien la posterior classificació taxonòmica. En el cas del MetONTIIME, aquest *clustering* es realitza *de novo* amb un percentatge d'identitat del 100% per evitar aquestes seqüències consens dels OTUs i aparellar directament els *reads* amb la base de dades, però aquest pas intermedi acaba donant resultats similars als observats per al *pipeline* q2ONT.

Si observem els grups taxonòmics inferiors, totes les estratègies d'anàlisi aconseguen identificar les famílies i gèneres que componen la *mock community* però les abundàncies relatives continuen sense coincidir amb les teòriques esperades. El gènere *Lactobacillus* queda infrarepresentat en tots els casos per sota del 7% d'abundància relativa, mentre *Bacillus* es veu sobrerepresentat amb valors per sobre de 30% (Figura 21B). A grans trets, les estratègies metagenòmiques aconseguen una bona classificació

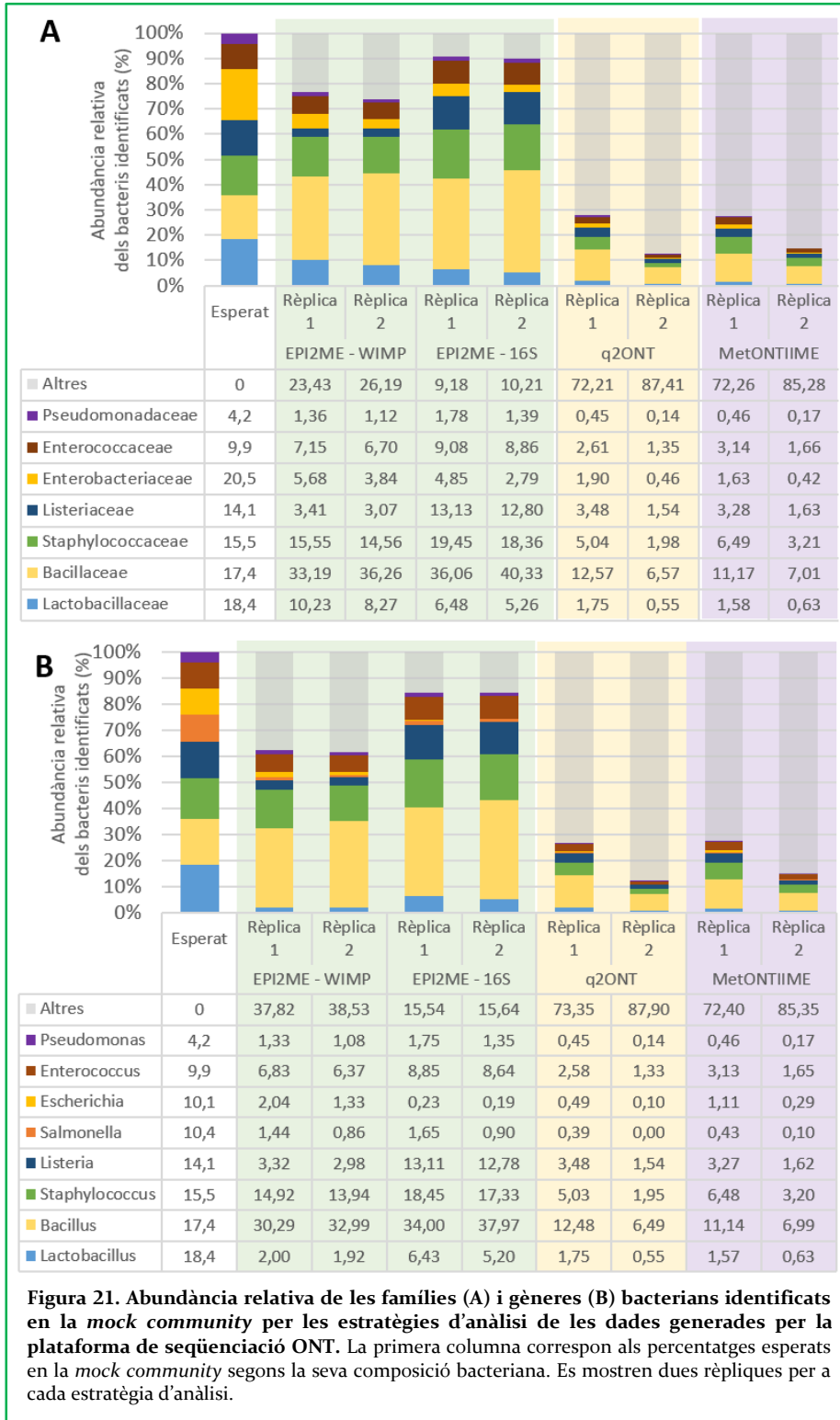
d'*Staphylococcus* amb unes mitjanes de 12,93% en el cas d'EPI2ME-WIMP i de 18,12% en EPI2ME-16S; i *Enterococcus* amb 6,6% i 8,75% respectivament.

D'igual manera que s'ha detallat amb les dades d'Illumina, en les dades de ONT tampoc s'ha pogut identificar correctament l'abundància de les *Enterobacteria*, que queden amb percentatges per sota del 2%. Trobem el mateix amb les *Pseudomonas* en el cas de la plataforma ONT.

Així, la principal diferència entre les dues alternatives metagenòmiques és que EPI2ME-16S assoleix una millor identificació dels gèneres *Lactobacillus* i *Listeria*. De fet, una prova chi-quadrat per comprovar l'ajust de cada estratègia amb les abundàncies esperades revela una millor classificació en el cas de EPI2ME-16S amb un estadístic de 97,44, mentre EPI2ME-WIMP presenta un 107,10. Les estratègies basades en l'entorn QIIME2 segueixen el mateix perfil observat en els filums i la suma de quadrats queda molt més elevada (137,89 per a q2ONT i 131,38 per a MetONTIIME).



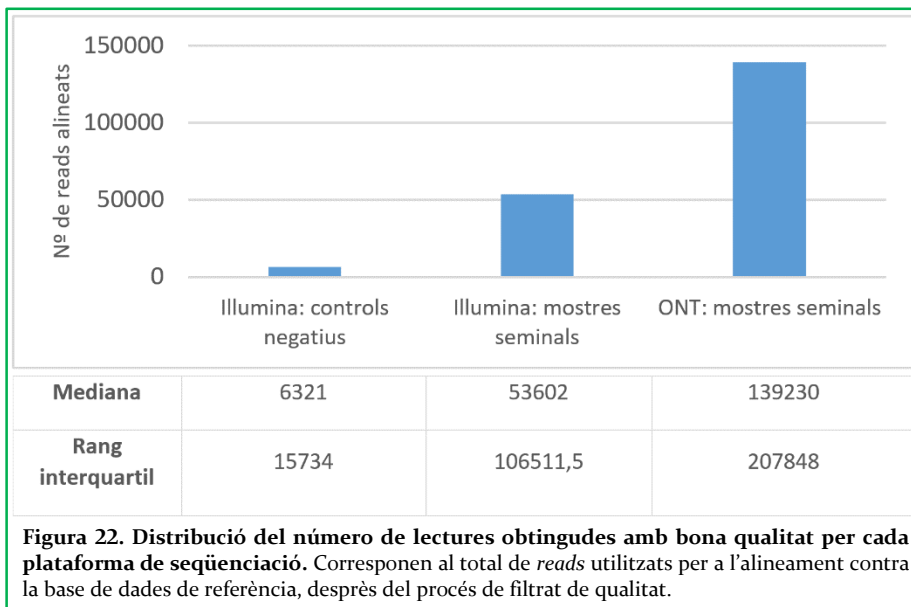
**Figura 20.** Abundància relativa dels filums identificats en la *mock community* per les estratègies d'anàlisi de les dades generades per la plataforma de seqüenciació ONT. La primera columna correspon als percentatges esperats en la *mock community* segons la seva composició bacteriana. Es mostren dos rèpliques per a cada estratègia d'anàlisi.



Aquests resultats demostren que, tot i presentar una classificació menys ajustada a la de la plataforma Illumina, tots els bacteris presents a la *mock community* han estat ben identificats per la plataforma ONT, però que aquesta presenta problemes per identificar correctament les seves abundàncies relatives. L'estratègia que millor s'ajusta a els resultats desitjats és l'anàlisi metagenòmica amb el *software* EPI2ME-16S i, per aquest motiu, s'ha escollit com mètode d'anàlisi per a les mostres seminals, sempre tenint en compte les peculiaritats en l'assignació de les abundàncies relatives. Igual que per a la plataforma d'Illumina, la família *Enterobacteria* tampoc s'ha identificat correctament. Això reforça la hipòtesi de que la metodologia d'extracció i amplificació del gen representa una limitació per a la identificació d'aquest taxó.

#### 4.4. Objectiu 4: Caracterització bacteriana del semen

La composició bacteriana del líquid seminal s'ha valorat emprant les dues plataformes de seqüenciació i l'anàlisi informàtic més adient segons les conclusions extretes a la secció anterior. El número de *reads* obtinguts a partir de la seqüenciació i amb qualitat suficient per a ser alineats es mostren



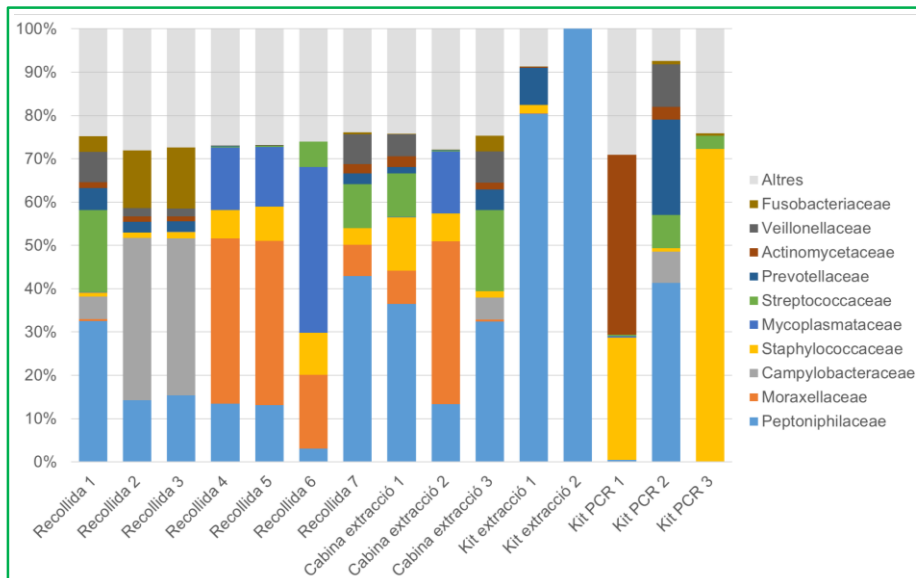
**Figura 22. Distribució del número de lectures obtingudes amb bona qualitat per cada plataforma de seqüenciació.** Corresponen al total de *reads* utilitzats per a l'alineament contra la base de dades de referència, després del procés de filtrat de qualitat.



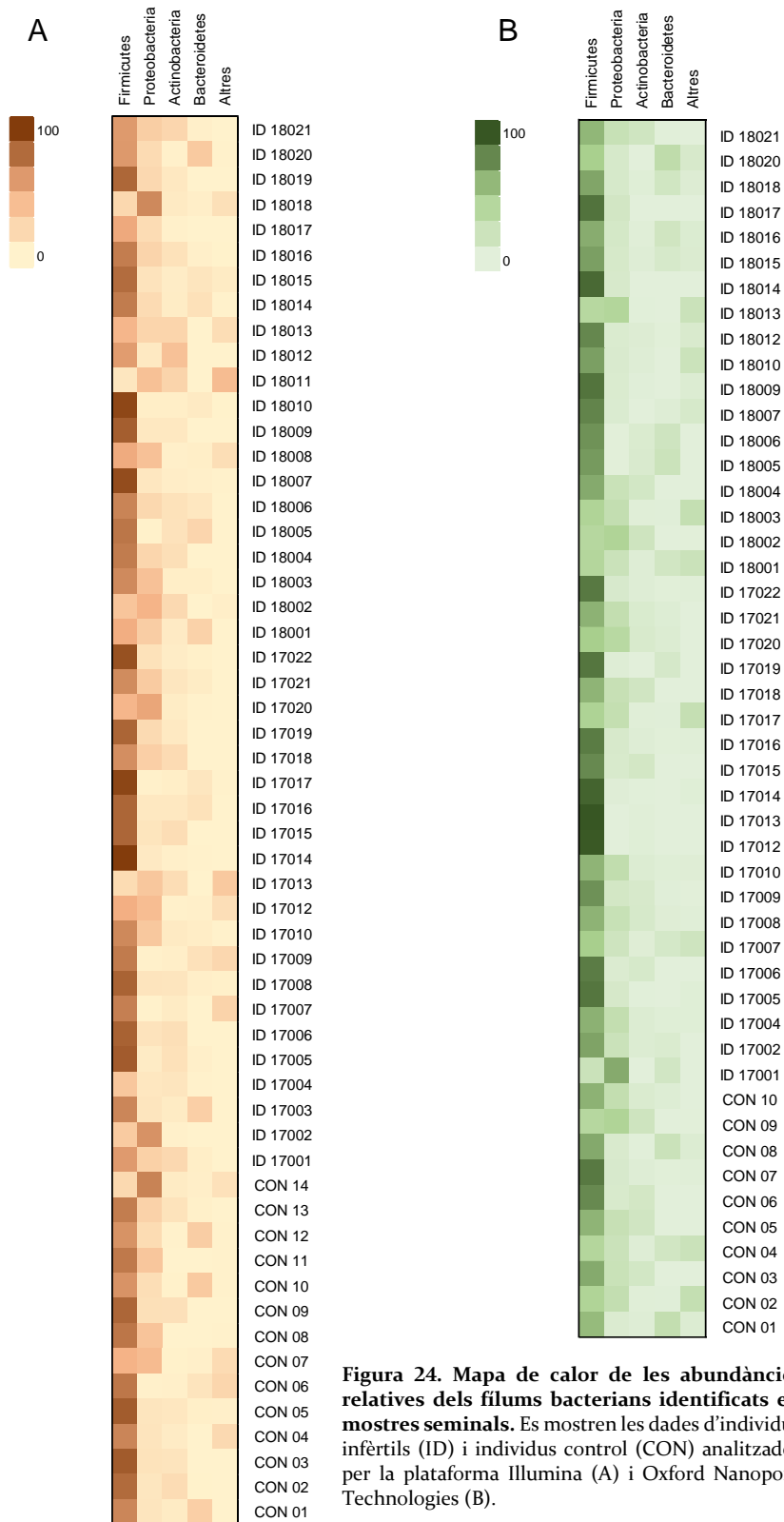
a la figura 22. Els resultats mostren que el número de lectures en els controls negatius (només seqüenciats per Illumina) és significativament inferior que en les mostres seminals, el que suggereix que la probabilitat de contaminació bacteriana externa que alteri els resultats és molt baixa. Tot i això, es mostren a la figura 23 els bacteris identificats en cada control negatiu.

Problemes en l'eficiència de seqüenciació d'una *flow cell* de la plataforma ONT no van permetre la valoració dels resultats de quatre mostres de pacients infèrtils i quatre mostres de donants amb fertilitat provada. Així, els resultats de la plataforma ONT compten amb 38 pacients infèrtils i 10 donants control.

A nivell de filum, la microbiota seminal de les mostres en estudi es compon principalment de quatre grups taxonòmics: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* (ordenats per abundància relativa general). Tots quatre filums representen més del 90% dels bacteris identificats tant per la plataforma Illumina com per ONT, on el més abundant en tots dos



**Figura 23. Famílies bacterianes identificades en els controls negatius realitzats al llarg del procediment de seqüenciació.** Es mostren set controls aleatoris de l'aire de la sala de recollida de les mostres en ordre cronològic, tres controls de l'aire de l'interior de la cabina d'extracció d'ADN, dos controls del kit d'extracció d'ADN i 3 controls del kit d'amplificació per PCR.



**Figura 24.** Mapa de calor de les abundàncies relatives dels filums bacterians identificats en mostres seminals. Es mostren les dades d'individus infèrtils (ID) i individus control (CON) analitzades per la plataforma Illumina (A) i Oxford Nanopore Technologies (B).

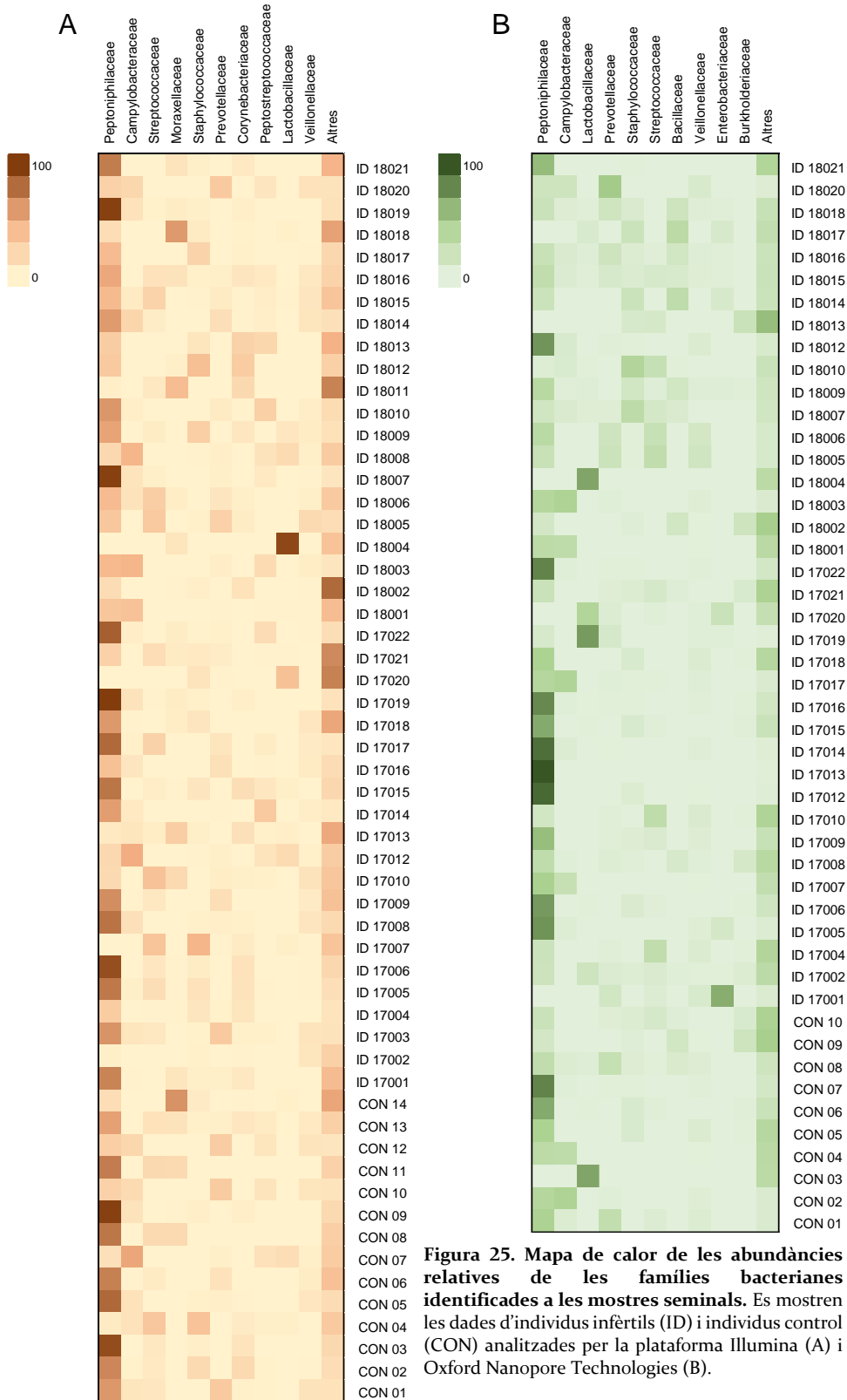
casos és el filum *Firmicutes* que representa aproximadament el 60% del total (Figura 24). *Firmicutes* és un grup de bacteris generalment grampositius amb grans parets cel·lulars i formes de bacil i coc. Les *Proteobacteries* són el filum més extens i divers, caracteritzat per presentar únicament bacteris gramnegatius amb parets cel·lulars formades per lipopolisacàrids. El filum *Actinobacteria* està integrat per bacteris grampositius predominantment aerobis amb forma de bacil o filamentosos. Finalment, *Bacteroidetes* conté bacils gramnegatius no esporulats amb formes diverses (Madigan *et al.*, 2015).

Aquesta composició a nivell de filum i l'abundància dels mateixos sembla estar en consonància amb estudis anteriors (Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021).

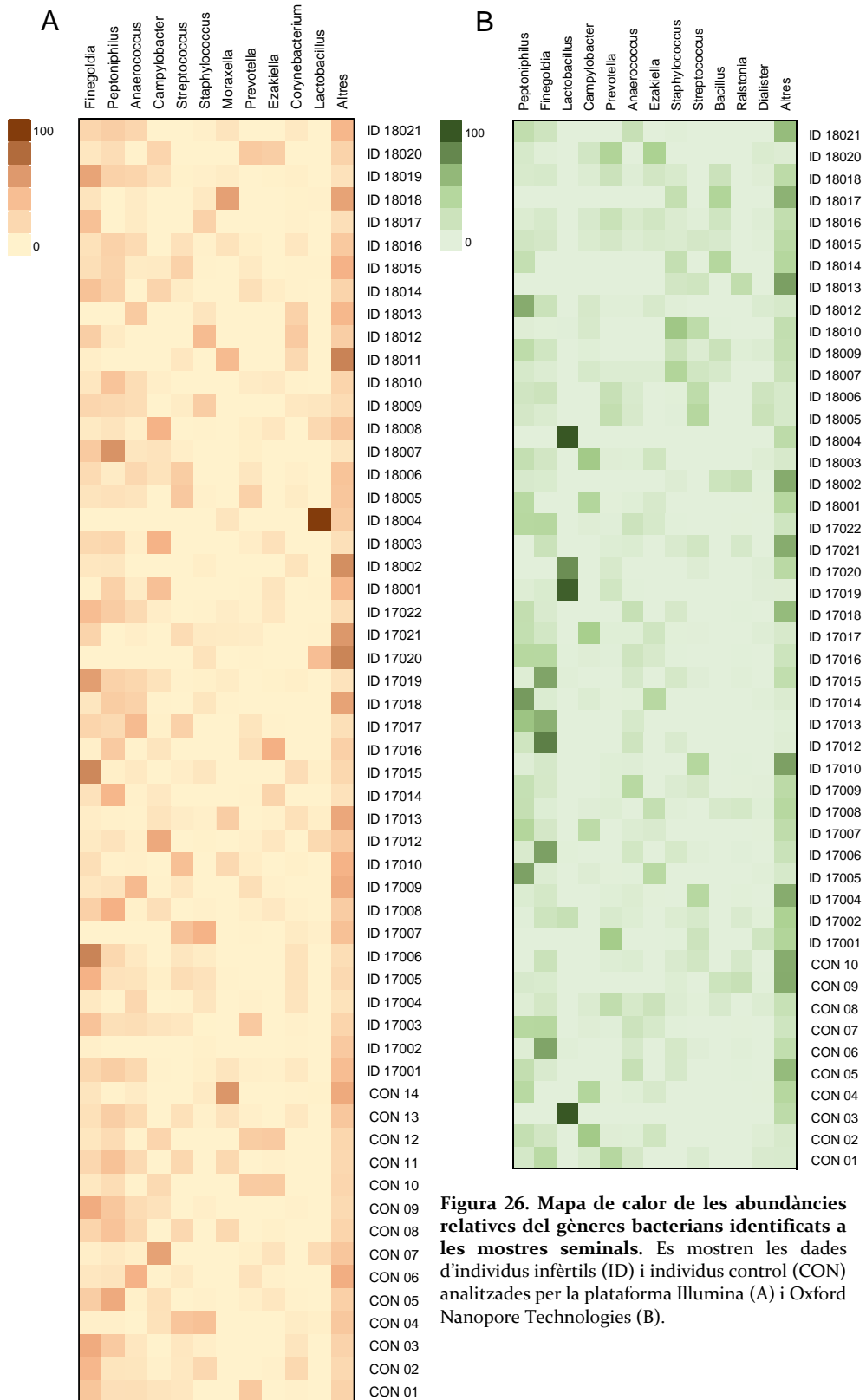
#### **4.4.1. Gèneres i famílies bacterianes identificades per Illumina**

De forma general, els gèneres bacterians més abundants en les mostres seminals analitzades per la plataforma Illumina són *Finegoldia*, *Peptoniphilus* i *Anaerococcus*, tots tres de la família *Peptoniphilaceae*, seguits dels gèneres *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Ezakiella*, *Corynebacterium* i *Lactobacillus* (Figura 26A). Aquests 11 gèneres suposen el 75,24% de tots els *reads* classificats, amb una abundància global mínima d'un 3%.

Paral·lelament, les 10 famílies bacterianes més abundants corresponen a les famílies a les quals pertanyen els gèneres anteriors (Figura 29), amb la excepció de *Peptostreptococcaceae* i *Veillonellaceae*. Aquestes dues famílies inclouen molts gèneres bacterians presents en quantitats menors a les dels gèneres especificats en el paràgraf anterior (Figura 25A). Aquestes 10 famílies més abundants suposen el 77,58% dels *reads* classificats a totes les mostres seminals, totes amb una abundància relativa global per sobre del 3%.



## Microbiota seminal i Integritat de l'ADN espermàtic



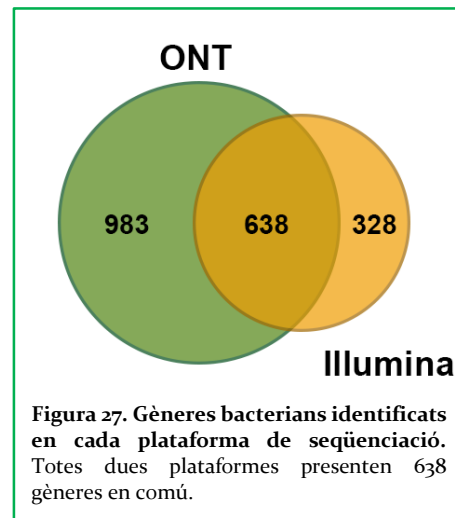
#### 4.4.2. Gèneres i famílies bacterianes identificades per ONT

En conjunt, els gèneres bacterians més abundants identificats per la plataforma ONT en les mostres seminals són *Peptoniphilus*, *Finegoldia*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Anaerococcus*, *Ezakiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Ralstonia* i *Dialister*, en ordre descendent d'abundància (Figura 26B). Tots 12 gèneres agrupen el 75,64% de tots els *reads* classificats, amb una abundància global mínima d'un 2%.

Les famílies bacterianes identificades com a més abundants també coincideixen amb els gèneres descrits, però addicionalment s'inclou la família *Enterobacteriaceae* (Figura 25B). El 77,09% dels *reads* han estat classificats en aquestes 10 famílies, cadascuna amb una abundància relativa global per sobre del 2%.

#### 4.4.3. Visió global de la composició microbiana seminal

Els resultats de la composició bacteriana de les mostres seminals extrets de les dues plataformes de seqüenciació presenten força similituds. L'anàlisi d'Illumina ha arribat a identificar un total de 966 gèneres bacterians diferents, mentre ONT ha estat capaç d'identificar-ne 1621, dels quals 638 són comuns en ambdues plataformes (Figura 27).



Tot i així, els gèneres amb més baixa freqüència poden ser artefactes de seqüenciació o de classificació. Només 168 gèneres en el cas d'Illumina (17,39% respecte dels 966 totals) i 124 en el cas de ONT (7,65% respecte dels 1621 totals) contenen com a mínim el 0,01% dels *reads* totals, dels quals 63 gèneres són comuns. Per tant, ONT té una taxa més elevada de *reads*

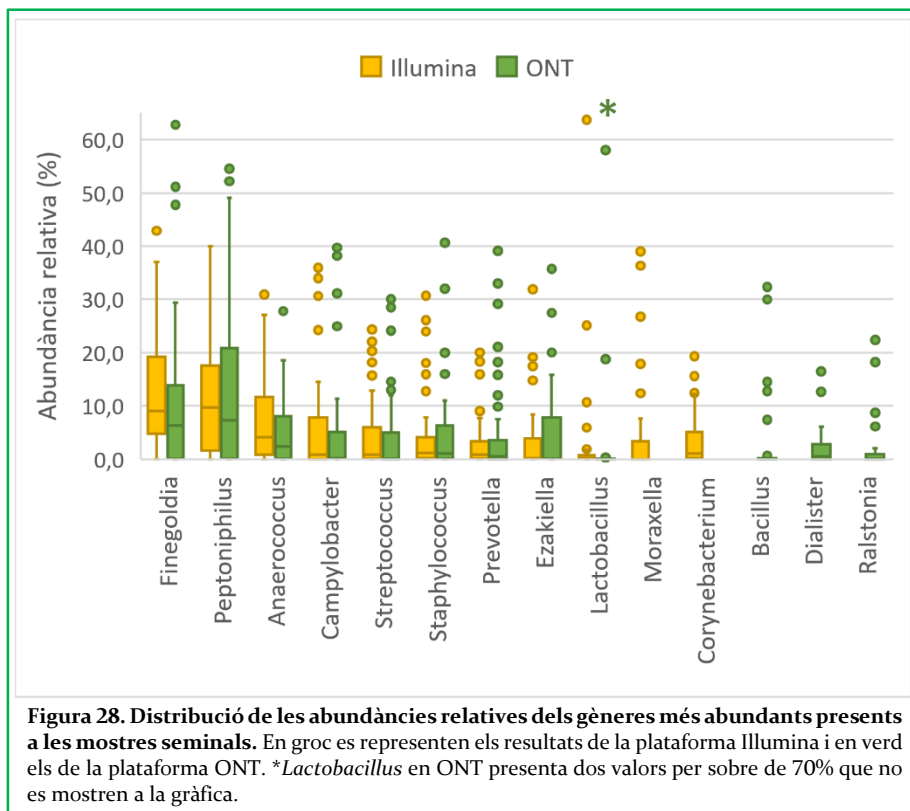
probablement classificats erròniament. En tots dos casos, més del 75% de les lectures classificades corresponen als 11–12 gèneres més abundants que, gairebé en la seva totalitat, coincideixen en els dos mètodes utilitzats.

Dins d'aquest 75%, els gèneres comuns en ambdues plataformes són *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Ezakiella* i *Lactobacillus*. Tots ells són gèneres que inclouen bacteris que habiten en condicions de nivells molt baixos d'oxigen, ja siguin anaeròbics estrictes (la família *Peptoniphilaceae* i el gènere *Ezakiella*), microaeròfils (*Campylobacter*) o anaeròbics facultatius. Són habituals de membranes epitelials i mucoses, pel que freqüentment es poden trobar a la pell o als tractes gastrointestinal i genitourinari. La majoria són grampositius tret dels gèneres *Campylobacter* i *Prevotella* i alguns s'han descrit com a patògens oportunistes.

Les abundàncies relatives d'alguns dels gèneres més freqüents divergeixen segons la plataforma d'anàlisi. Per exemple, *Moraxella* i *Corynebacterium*, malgrat identificar-se en les dues plataformes d'anàlisi, només es troben entre els 11 gèneres més representats en la plataforma Illumina. Per contra, *Bacillus*, *Ralstonia* i *Dialister*, els quals formen part dels 12 gèneres més abundants segons la plataforma ONT, es detecten de manera menys freqüent en la plataforma Illumina. És interessant observar que la família a la que pertany *Dialister*, *Veillonellaceae* (Figura 29), sí que és una de les famílies més abundants identificades per Illumina, el que podria ser un reflex de petits errors de classificació en l'anàlisi d'Illumina en aquest grup taxonòmic.

Tot i això, les abundàncies relatives de cada gènere descrit presenten similituds entre Illumina i ONT, tal i com es pot observar a la figura 28. Tal com han trobat altres autors, aquestes abundàncies presenten una gran variabilitat interindividual, fet que s'evidencia en la presència d'unes barres d'error llargues i molts valors extrems (Hou *et al.*, 2013; Mändar *et al.*, 2017; Baud *et al.*, 2019; Lundy *et al.*, 2021).

Respecte a la contaminació bacteriana, el fet que en l'anàlisi dels controls negatius s'hagi obtingut un nombre molt baix de lectures indica que la probabilitat de contaminació de les mostres és baixa (Figura 22). Si ens fixem en la composició bacteriana d'aquests controls (Figura 23) es pot extreure que a la sala de recollida de la mostra hi ha presència de *Peptoniphilaceae*, *Moraxellaceae*, *Campylobacteraceae* i *Mycoplasmataceae*; i a la cabina d'extracció hi ha *Peptoniphilaceae* i *Moraxellaceae*. D'aquests, l'únic bacteri descrit a la bibliografia com a un contaminant habitual en medis de cultiu és *Mycoplasmataceae* (Uphoff i Drexler, 2014), el qual no es troba en una proporció important en les mostres seminals. Respecte al "kitoma", el kit d'extracció sembla presentar únicament *Peptoniphilaceae*, la família més abundant identificada a les mostres seminals, mentre el kit de PCR presenta *Staphylococcaceae*, *Peptoniphilaceae* i *Actinomycetaceae*.



**Figura 28. Distribució de les abundàncies relatives dels gèneres més abundants presents a les mostres seminals.** En groc es representen els resultats de la plataforma Illumina i en verd els de la plataforma ONT. \**Lactobacillus* en ONT presenta dos valors per sobre de 70% que no es mostren a la gràfica.



Els resultats que s'han obtingut en aquest experiment són també consistents amb la bibliografia. Els tres gèneres més abundants a les nostres dades (*Finegoldia*, *Peptoniphilus* i *Anaerococcus*) també s'han descrit com a molt rellevants en diversos estudis previs sobre microbiota seminal (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019) tot i que en cap d'ells representaven els gèneres més abundants. De fet, *Lactobacillus* és el gènere que s'ha identificat més freqüentment com a predominant (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). En el nostre cas, *Lactobacillus* representa un percentatge més baix d'abundància relativa, fet també observat per Monteiro i Lundy (Monteiro *et al.*, 2018; Lundy *et al.*, 2021); amb excepció d'alguns pocs individus que presenten percentatges molt elevats d'aquest gènere (Figures 26 i 28).

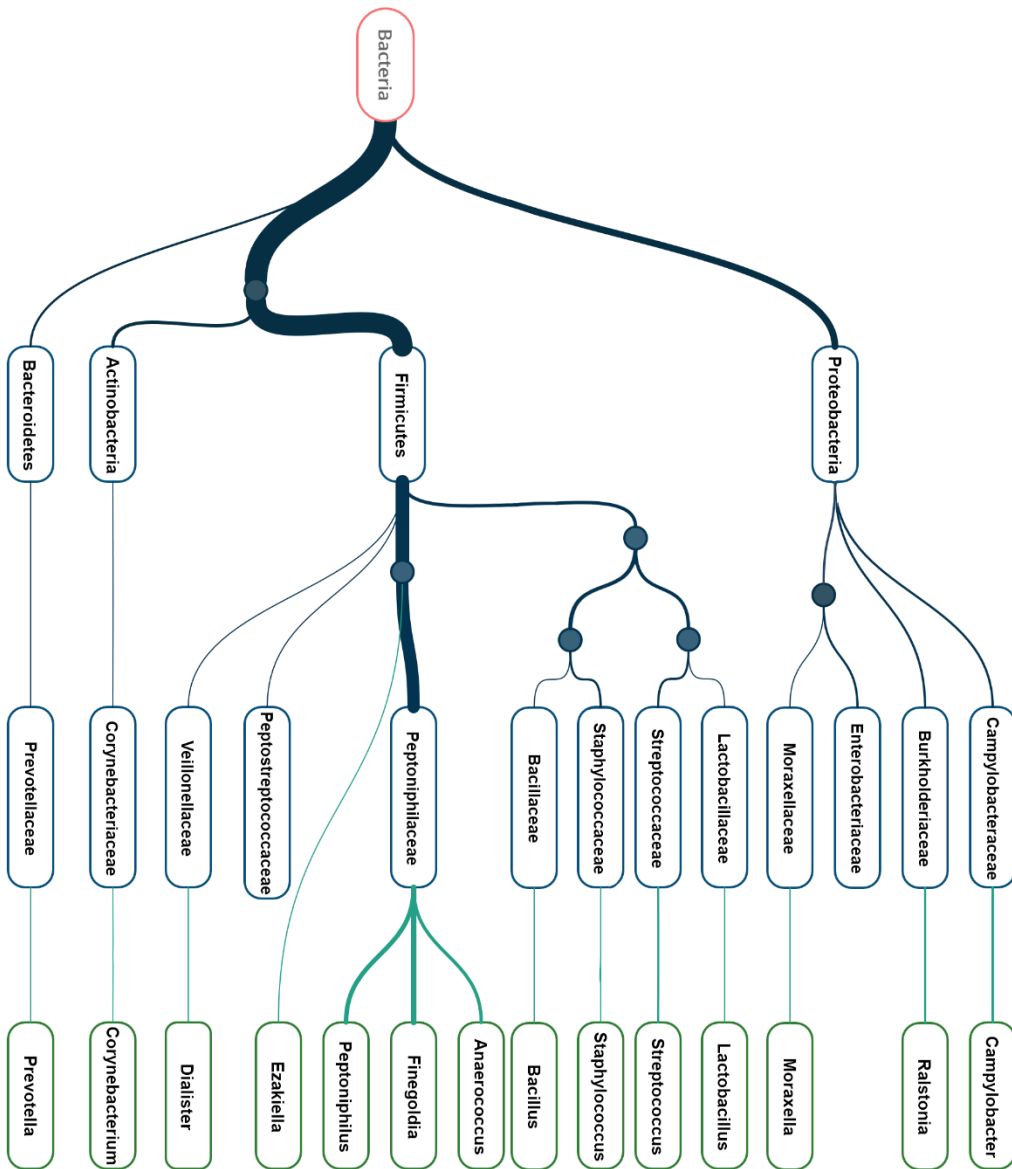
Dins la classe *Bacilli* també s'han destacat *Streptococcus* i *Staphylococcus* com a gèneres recurrents en el plasma seminal (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019), contràriament al gènere *Bacillus* identificat per ONT en les nostres mostres i que només ha estat descrit com a rellevant per Chen (Chen *et al.*, 2018). *Dialister* i la seva família *Veillonellaceae*, també s'han descrit freqüentment, però amb abundàncies més contingudes com en el nostre cas (Hou *et al.*, 2013; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021). Finalment, l'últim *Firmicutes* identificat a les nostres dades, *Ezakiella*, no ha estat mai detectat en mostres seminals. Les diferències observades en tots aquests treballs podrien atribuir-se a diferents factors, desconeguts a dia d'avui, però que podrien tenir relació amb variables com la metodologia emprada, la regió geogràfica de les mostres recollides i les seves condicions ambientals, l'activitat sexual dels individus estudiats o, inclús, l'estil de vida i la dieta.

Els *Proteobacteria* més rellevants en el nostre anàlisi han estat *Campylobacter*, *Moraxella* i *Ralstonia*. D'aquests, *Campylobacter* és el que s'ha descrit amb

més freqüència (Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019). *Ralstonia* també s'ha arribat a aïllar, però només l'estudi de Hou i col·laboradors en destaca la seva abundància (Hou *et al.*, 2013). *Moraxella* només s'ha destacat en grups amb elevada viscositat (Monteiro *et al.*, 2018).

Els nostres resultats mostren que el gènere més representatiu del filum *Actinobacteria* és *Corynebacterium*. Això coincideix amb les observacions publicades per altres autors (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021). El gènere *Prevotella*, principal membre del filum *Bacteroidetes*, és un dels bacteris més recurrents en la bibliografia, associat amb freqüència a mala qualitat seminal (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Lundy *et al.*, 2021).

Alguns dels bacteris identificats en aquest experiment pertanyen també a la microbiota genital femenina. El grup taxonòmic predominant al tracte vaginal és *Lactobacillus*, tot i que també s'hi ha trobat *Prevotella*, *Dialister*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Ezakiella* i *Finegoldia*. (Ravel *et al.*, 2011; Gajer *et al.*, 2012; Human Microbiome Project Consortium, 2012b; Mändar *et al.*, 2015; Diop *et al.*, 2017; Koedooder *et al.*, 2019). Al cervix hi ha presència de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* (Koedooder *et al.*, 2019). Aquestes coincidències podrien ser evidències d'una possible relació entre les microbiotes masculina i femenina i fan interessant estudiar les possibles interaccions entre les dues poblacions bacterianes d'una parella sexualment activa.



**Figura 29.** Arbre filogenètic dels bacteris identificats més abundants en les mostres seminals. L'amplada dels connectors és proporcional a la abundància relativa observada de forma global.

#### **4.5. Objectiu 5: Estudi de relació entre la microbiota seminal i la infertilitat**

La relació entre la microbiota seminal i la infertilitat masculina s'ha valorat a diferents nivells a través de les abundàncies relatives de cada grup bacterià. En primer lloc s'han estudiat les diferències d'abundàncies entre els grups clínics presents a l'estudi per, a continuació, fer un estudi de correlació amb els paràmetres seminals i espermàtics.

Atès que els resultats de l'objectiu 3 de la plataforma Illumina han estat molt més precisos que els de ONT en quant a les abundàncies relatives bacterianes i que es van descartar vuit mostres de la plataforma ONT per problemes d'eficiència, es van realitzar els estudis de relació amb la fertilitat utilitzant les dades extretes per Illumina per tal d'evitar biaix i disposar de tota la informació possible.

##### **4.5.1. Microbiota seminal, edat i hàbits de consum**

L'edat pot ser un factor important que influeix en la microbiota i, per aquest motiu, s'ha realitzat un estudi de correlació per conèixer quins grups bacterians hi poden estar influenciats. Un test de correlació d'Spearman mostra que les famílies *Thermoanaerobacteraceae* i *Tissierellaceae* i els gèneres *Gardnerella* i *Tepidanaerobacter* presenten una correlació positiva amb l'edat. Paral·lelament, els gèneres *Veillonella* i *Brevundimonas* presenten una correlació negativa. Els grups clínics d'aquest estudi presenten unes edats de 36,67 [30–48] per al grup dels individus fèrtils, 29,00 [25–40] per al grup dels individus de població general i 39,62 [26 – 48] per al grup d'infèrtils. Així, tot i que els rangs són bastant semblants en els tres casos, el grup de població general presenta una edat mitjana significativament més baixa que la resta, pel que els bacteris descrits a dalt podrien presentar abundàncies relatives esbiaixades.

Respecte al consum d'estupefaents, els individus fumadors presenten diferències en dos gèneres de la família *Veillonellaceae* (*Veillonella* i *Megasphaera*) i en el gènere *Filifactor*. De tota la mostra poblacional seleccionada, només 7 individus són fumadors. També s'observen diferències entre els individus que prenen poc o molt alcohol per al gèneres *Brevundimonas*, *Flavobacterium* i *Sphingomonas*, els quals no estan directament relacionats amb begudes. La distribució de consum de begudes alcohòliques en la mostra seleccionada és homogènia en tots els grups.

El consum de cafeïna sembla ser el factor amb més repercussió sobre la abundància relativa de la microbiota. Entre els grups d'individus que consumeixen un cafè o beguda amb cafeïna al dia i els que en consumeixen més d'un al dia es troben diferències en el filum *Bacteroidetes*, les famílies *Prevotellaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Hungateiclostridiaceae* i els gèneres *Finegoldia*, *Prevotella*, *Ralstonia*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Schaalia* i *Actinotignum*. Un estudi de correlació entre la quantitat de cafeïna diària en mg i les abundàncies relatives mostra relacions positives amb *Prevotella*, *Gardnerella*, *Deinococcus* i *Aerococcus*, i relacions negatives amb *Finegoldia*, *Cutibacterium*, *Paracoccus* i *Kocuria*. Estudis recents han descrit com la cafeïna modula la composició de la microbiota intestinal (Nishitsuji *et al.*, 2018; González *et al.*, 2020) però encara no es coneixen els mecanismes pels quals això succeeix. Algunes hipòtesis apunten a l'efecte de la cafeïna sobre la secreció de citocines que regulen la inflamació (Vitaglione *et al.*, 2010) però també podrien estar-hi implicats altres components del cafè com els fenols, els quals afavoririen determinats bacteris amb capacitat de metabolitzar-los (Aura, 2008). Alguns fenols, a més, han estat relacionats tant positiva com negativament amb l'estrès oxidatiu i la fragmentació d'ADN (Allai *et al.*, 2016; Kiwitt-Cárdenas *et al.*, 2021; Simas *et al.*, 2021). En tot cas, la distribució de consum de cafeïna en la mostra poblacional seleccionada és homogènia en tots els grups.

#### 4.5.2. Microbiota seminal i grups clínics

Les mostres seminals recollides en aquest estudi han estat classificades, segons el fenotip dels individus, en tres grups: controls amb fertilitat provada (fèrtils), donants de població general amb fertilitat no provada (general) i pacients infèrtils idiopàtics (infèrtils). Les diferències entre grups han estat valorades amb una prova U de Mann Whitney.

**Taula 15. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus fèrtils i de població general.** Les abundàncies relatives es mostren en percentatges.

	Fèrtils	General
<b>Fílums</b>		
<i>Proteobacteria</i>	25,69	9,33
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,001	0,006
<b>Famílies</b>		
<i>Moraxellaceae</i> **	10,12	0,03
<i>Rhodobacteraceae</i>	0,41	0,00
<i>Paenibacillaceae</i> **	0,01	0,05
<i>Enterococcaceae</i>	0,01	0,02
<i>Deinococcaceae</i>	0,000	0,004
<b>Gèneres</b>		
<i>Moraxella</i> **	9,95	0,00
<i>Sphingomonas</i>	0,09	0,00
<i>Megasphaera</i>	0,002	0,060
<i>Paenibacillus</i> **	0,01	0,04
<i>Enterococcus</i>	0,01	0,02
<i>Propionimicrobium</i>	0,003	0,012
<i>Deinococcus</i>	0,000	0,004

\*\*p-valor < 0,01

El grup de fèrtils i el grup general presenten diferències entre ells a tots els nivells taxonòmics. A nivell de filum, els individus fèrtils presenten uns nivells significativament més alts de *Proteobacteria* i significativament més baixos de *Deinococcus-Thermus* (Taula 15). No obstant, *Deinococcus-Thermus* presenta abundàncies per sota de 0,05% en aquests grups. Els gèneres amb un p-valor per sota de 0,01 són *Moraxella* i *Paenibacillus*, també molt significatius a nivell de família. D'aquests, *Moraxella* és el

**Taula 16. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus fèrtils i infèrtils. Les abundàncies relatives es mostren en percentatges.**

	Fèrtils	Infèrtils
<b>Famílies</b>		
<i>Moraxellaceae</i>	10,12	0,37
<i>Bacillaceae</i>	0,07	0,19
<i>Paenibacillaceae</i>	0,01	0,04
<i>Enterococcaceae</i>	0,00	0,01
<i>Deinococcaceae</i>	0,000	0,001
<b>Gèneres</b>		
<i>Moraxella</i>	9,952	0,003
<i>Cutibacterium**</i>	0,14	0,21
<i>Rhodopseudomonas</i>	0,000	0,001

\*\*p-valor < 0,01

que presenta unes diferències més notòries, observant-se en un 9,95% de mediana en els individus fèrtils i estant pràcticament absent en el grup general.

Entre els grups de fèrtils i infèrtils, diverses famílies bacterianes presenten diferències d'abundància (Taula 16). Entre elles, hi trobem també *Moraxellaceae* i *Paenibacillaceae*. Però les diferències estadísticament més significatives les trobem amb el gènere *Cutibacterium*, amb més presència en individus infèrtils, al igual que *Rhodopseudomonas*. També s'observen diferències en el gènere *Moraxella*.

El grup general i el grup d'infèrtils presenten diferències menys significatives que les trobades en les comparacions anteriors. Només les famílies *Propionibacteriaceae* i *Rhodobacteraceae*, i els gèneres *Moraxella*, *Paenibacillus* i *Deinococcus*, presenten diferències (Taula 17).

**Taula 17. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus general i infèrtils.** Les abundàncies relatives es mostren en percentatges.

	General	Infèrtils
<b>Famílies</b>		
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,14	0,73
<i>Rhodobacteraceae</i>	0,00	0,01
<b>Gèneres</b>		
<i>Paenibacillus</i>	0,04	0,03
<i>Deinococcus</i>	0,004	0,001
<i>Moraxella</i>	0,000	0,003

**Taula 18. Abundàncies relatives medianes dels grups bacterians significativament diferents entre els grups d'individus control i infèrtils.** Les abundàncies relatives es mostren en percentatges. El grup control inclou els grups de donants fèrtils i de població general, tal i com es descriu al contingut.

	Control	Infèrtils
<b>Famílies</b>		
<i>Propionibacteriaceae</i> **	0,18	0,73
<b>Gèneres</b>		
<i>Cutibacterium</i>	0,01	0,21
<i>Oligotropha</i>	0,002	0,078
<i>Rhodopseudomonas</i> **	0,000	0,001

\*\*p-valor < 0,01

Finalment, si s'agrupen els individus dels grups fèrtils i general en un únic grup (control) i es contraposa amb el grup d'infèrtils, es troben diferències molt significatives en les abundàncies de la família *Propionibacteriaceae*, en especial en el seu gènere *Cutibacterium*. També hi ha una diferència molt significativa en el gènere *Rhodopseudomonas*, només present en alguns individus infèrtils, i menys notòria en el gènere *Oligotropha* (Taula 18).

Sintetitzant, els resultats de les comparatives realitzades ens permeten concloure que, en individus de fertilitat provada, el gènere *Moraxella* és troba en altes proporcions, mentre que s'hi troben reduïdes les abundàncies de les famílies *Bacillaceae* i *Paenibacillaceae*.

Alguns dels pacients infèrtils idiopàtics presenten també el gènere *Moraxella* en proporcions importants, però la signatura microbiana característica en aquest grup és la presència significativa de la família *Propionibacteriaceae* (principalment *Cutibacterium*) i els gèneres *Oligotropha* i *Rhodopseudomonas* (Taula 18).



#### 4.5.3. Microbiota seminal i seminograma

Els paràmetres de qualitat seminal que s'han valorat en aquest estudi mitjançant seminograma són el volum, el pH i la viscositat seminals i la concentració (i número total), la motilitat (total i progressiva) i la morfologia espermàtiques. S'ha estudiat la correlació entre aquestes variables i les abundàncies relatives de tots els grups bacterians amb una presència major a 0,05% en almenys algun individu (Taula 19).

El volum seminal correlaciona positivament amb els gèneres bacterians *Ralstonia*, *Bacillus* i *Steroidobacter*, de manera que a més volum més abundants són aquests bacteris. Per contra, el gènere *Janibacter* presenta una correlació negativa i és més present en mostres amb volums baixos.

El pH seminal presenta una correlació molt significativa amb la família *Neisseriaceae*, que també s'observa en el gènere *Neisseria*. En aquest cas, a major abundància d'aquest gènere, més elevat és el pH. Aquest gènere presenta un metabolisme on, a pH 7.2–8.0, el cicle de l'àcid tricarbòxilic no és actiu i utilitza vies metabòliques alternatives (via d'Entner-Doudoroff i via de les pentoses fosfat), el que produeix una acumulació d'acetat en el medi i un conseqüent increment del pH (Morse i Hebel, 1978). La família *Leptotrichiaceae* també correlaciona positivament amb el pH seminal, quelcom contradictori amb la seva activitat metabòlica eminentment fermentativa amb productes àcids com el làctic, acètic, fòrmic o succínic (Eisenberg *et al.*, 2018).

S'han observat correlacions negatives amb la viscositat seminal a nivell de família i gènere. La correlació més significativa s'ha detectat amb *Comamonadaceae*, una família de bacteris gramnegatius generalment mòtils flagel·lats (Willems i Gillis, 2015), que podrien veure's afavorits per medis més líquids on poder moure's amb més llibertat. Altres famílies com *Pasteurellaceae* i *Promicromonosporaceae* (concretament el seu gènere *Xylanimonas*) també s'observen en major abundància relativa en medis

menys viscosos. Per una altra banda, dos gèneres presenten també una correlació molt significativa: *Ralstonia* i *Megasphaera*, membres d'unes de les famílies més abundants al semen, *Burkholderiaceae* i *Veillonellaceae* respectivament. Algunes espècies de *Ralstonia* presenten motilitat flagel·lar i d'altres produeixen hidrogenases (Yabuuchi *et al.*, 2015). Diversos estudis demostren com diversos tipus d'hidrolases poden reduir la viscositat seminal, via activitat enzimàtica, tant en models animals com en humà (Bravo *et al.*, 2000; Kershaw-Young *et al.*, 2013; Ansari *et al.*, 2018; Nosi *et al.*, 2019). Sobre *Megasphaera*, se sap que no presenta activitat hidrolítica quan s'ha aïllat en gelatines i llet, però en canvi secreta alguns àcids com l'àcid acètic, propiònic, butíric o valèric, que resulten del seu metabolisme (Marchandin *et al.*, 2015). Aquests àcids podrien actuar sobre el líquid seminal degradant alguns dels seus components fibrosos, resultant en una menor viscositat de l'ejaculat. Hi ha altres gèneres que també correlacionen negativament amb la viscositat, però no d'una manera tant significativa. Entre ells, destaquen *Finegoldia*, *Schaalia* i *Aerococcus*, dels quals també s'ha descrit que poden secretar àcids com a producte metabòlic (Collins i Falsen, 2015; Ezaki, 2015). Els resultats obtinguts mostren que el nombre total de gàmetes d'una mostra no correlaciona amb cap grup taxonòmic bacterià. En canvi, s'han trobat correlacions negatives entre la concentració espermàtica, les famílies *Paenibacillaceae* (concretament amb el gènere *Paenibacillus*) i *Lachnospiraceae* i amb el gènere *Ralstonia*. Aquest últim també presenta una correlació positiva amb el volum seminal. Així, a major volum seminal, més abundància de *Ralstonia* i menor concentració espermàtica.

La motilitat espermàtica es pot valorar en general o segons la seva qualitat, motiu pel qual s'han utilitzat tant la motilitat total com la progressiva per valorar associacions amb la microbiota. En el nostre estudi, la motilitat total ha correlacionat positivament i de manera molt significativa amb el gènere *Filifactor*. Els bacteris que hi pertanyen secreten productes metabòlics com l'acetat i el butirat, els quals formen part de sistemes i compostos que poden

Taula 19. Correlacions entre els paràmetres del seminograma i els grups bacterians

Paràmetre		Estadístic
<b>Motilitat total</b>	<b>Famílies</b>	
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,293*
	<i>Sphingomonadaceae</i>	-0,291*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Filifactor</i>	0,369**
<b>Motilitat progressiva</b>	<b>Famílies</b>	
	<i>Propionibacteriaceae</i>	0,290*
	<i>Caulobacteraceae</i>	0,331*
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,362**
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Peptoniphilus</i>	-0,306*
	<i>Gardnerella</i>	0,289*
<i>Flavobacterium</i>	0,292*	
<b>Morfologia</b>	<b>Famílies</b>	
	<i>Moraxellaceae</i>	0,351*
	<i>Oxalobacteraceae</i>	0,374*
	<i>Bifidobacteraceae</i>	-0,326*
	<i>Deinococcaceae</i>	-0,384**
	<i>Erwiniaceae</i>	-0,360*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Moraxella</i>	0,357*
	<i>Massilia</i>	0,337*
	<i>Gardnerella</i>	-0,417**
<i>Deinococcus</i>	-0,384**	
<i>Gemella</i>	-0,325*	

\*p-valor < 0,05; \*\*p-valor < 0,01

## Microbiota seminal i Integritat de l'ADN espermàtic

<b>Paràmetre</b>		<b>Estadístic</b>	
<b>Volum</b>	<b>Gèneres</b>		
	<i>Ralstonia</i>	0,307*	
	<i>Bacillus</i>	0,284*	
	<i>Steroidobacter</i>	0,272*	
	<i>Janibacter</i>	-0,266*	
<b>pH seminal</b>	<b>Families</b>		
	<i>Neisseriaceae</i>	0,345**	
	<i>Leptotrichiaceae</i>	0,291*	
	<b>Gèneres</b>		
	<i>Neisseria</i>	0,332*	
<b>Viscositat seminal</b>	<b>Families</b>		
	<i>Comamonadaceae</i>	-0,386**	
	<i>Pasteurellaceae</i>	-0,309*	
	<i>Promicromonosporaceae</i>	-0,325*	
	<b>Gèneres</b>		
	<i>Finegoldia</i>	-0,268*	
	<i>Ralstonia</i>	-0,346**	
	<i>Schaalia</i>	-0,289*	
	<i>Aerococcus</i>	-0,290*	
	<i>Xylanimonas</i>	-0,325*	
	<i>Megasphaera</i>	-0,356**	
	<b>Concentració espermàtica</b>	<b>Families</b>	
		<i>Paenibacillaceae</i>	-0,336*
<i>Lachnospiraceae</i>		-0,341*	
<b>Gèneres</b>			
<i>Paenibacillus</i>		-0,328*	
<i>Ralstonia</i>	-0,322*		

modular la capacitat i l'activitat dels espermatozoides (Alhaj *et al.*, 2018; Kurata *et al.*, 2019; Mizera *et al.*, 2019). A nivell de família, s'ha trobat que els *Bifidobacteriaceae* correlacionen positivament amb la motilitat total i, especialment, amb la motilitat progressiva. Aquest fet ja s'havia documentat prèviament en estudis que analitzaven l'efecte sobre la qualitat seminal de determinats probiòtics antioxidants, entre els quals s'inclouïa *Bifidobacteria* (Valcarce *et al.*, 2017, 2019). Aquests bacteris amb propietats antioxidants podrien mitigar la producció de ROS mitocondrial espermàtica, tot i que es desconeix el mecanisme molecular involucrat, requerint estudis específics sobre aquesta qüestió. No obstant, la bibliografia analitzada també presenta resultats contradictoris entre diferents grups de recerca sobre la relació d'altres gèneres de la família *Bifidobacteriaceae*, com *Gardnerella*, amb la motilitat (Weng *et al.*, 2014; Lundy *et al.*, 2020). En la nostra anàlisi, *Gardnerella* correlaciona positivament amb la motilitat progressiva.

Fora dels *Bifidobacteriaceae*, la família dels *Propionibacteriaceae* i la dels *Caulobacteraceae*, juntament amb el gènere *Flavobacterium*, també correlacionen de manera positiva amb la motilitat progressiva. En el cas de *Propionibacteriaceae*, alguns estudis han associat la seva presència a una bona qualitat seminal (Weng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020). Paral·lelament, s'observa una correlació negativa de la motilitat total amb la família *Sphingomonadaceae* i de la motilitat progressiva amb el gènere *Peptoniphilus*, un dels més abundants en les mostres seminals segons aquest estudi.

Finalment, la morfologia espermàtica ha correlacionat amb alguns grups bacterians, destacant una correlació negativa molt significativa amb la família *Deinococcaceae* (especialment el gènere *Deinococcus*) i el gènere *Gardnerella*. També hi ha bacteris que correlacionen positivament com els gèneres *Moraxella* i *Massilia*, també observable a nivell de família. Es fa difícil explicar el significat biològic d'aquesta correlació, pel que serien necessaris estudis addicionals que esclareixin el paper de la microbiota sobre la morfologia espermàtica.

#### 4.5.4. Microbiota seminal i integritat de l'ADN espermàtic

La integritat de l'ADN s'ha valorat segons tres factors: l'estrès oxidatiu, mesurant el potencial oxidant-reductor a través de l'aparell MiOXSYS (sORP); l'estat de compactació de la cromatina, amb el test de cromomicina A3 (CMA3); i la fragmentació de l'ADN espermàtic, avaluat amb els assaigs TUNEL i Comet. S'ha estudiat la correlació entre aquestes variables i les abundàncies relatives de tots els grups bacterians amb una presència major a 0,05% en almenys algun individu (Taula 20).

Taula 20. Correlacions entre els paràmetres d'integritat de l'ADN i els grups bacterians

Paràmetre		Estadístic
sORP	<b>Famílies</b>	
	<i>Paenibacillaceae</i>	0,323*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Brevundimonas</i>	-0,280*
	<i>Paenibacillus</i>	0,321*
	<i>Megasphaera</i>	0,297*
	<i>Rhodopseudomonas</i>	0,310*
	<i>Oligotropha</i>	0,279*
CMA3	<b>Famílies</b>	
	<i>Sphingomonadaceae</i>	0,301*
	<i>Paenibacillaceae</i>	-0,390**
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Ralstonia</i>	-0,326*
	<i>Bacillus</i>	-0,284*
	<i>Schaalia</i>	0,353**
	<i>Paenibacillus</i>	-0,358**
	<i>Sphingomonas</i>	0,281*

\*p-valor < 0,05; \*\*p-valor < 0,01

## Microbiota seminal i Integritat de l'ADN espermàtic

Paràmetre		Estadístic
<b>TUNEL</b>	<b>Families</b>	
	<i>Caulobacteraceae</i>	-0,376**
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Brevundimonas</i>	-0,365**
	<i>Oligotropha</i>	-0,270*
<b>Comet alcalí</b>	<b>Families</b>	
	<i>Moraxellaceae</i>	-0,288*
	<i>Lactobacillaceae</i>	-0,285*
	<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	0,294*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Moraxella</i>	-0,343**
	<i>Lactobacillus</i>	-0,280*
	<i>Cutibacterium</i>	-0,298*
	<i>Murdochiella</i>	0,282*
	<i>Acinetobacter</i>	-0,266*
	<i>Brevundimonas</i>	-0,292*
	<i>Flavobacterium</i>	-0,317*
	<i>Sphingomonas</i>	-0,296*
	<i>Tepidanaerobacter</i>	0,272*
<b>Comet alcalí (OTM)</b>	<b>Families</b>	
	<i>Rhodobacteraceae</i>	-0,317*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Moraxella</i>	-0,319*
	<i>Flavobacterium</i>	-0,307*
<i>Sphingomonas</i>	-0,312*	
<i>Enterococcus</i>	0,279*	

\*p-valor < 0,05; \*\*p-valor < 0,01

Paràmetre		Estadístic
Comet neutre	<b>Famílies</b>	
	<i>Paenibacillaceae</i>	,290*
	<i>Enterococcaceae</i>	,304*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Mobiluncus</i>	,289*
	<i>Gemella</i>	,308*
	<i>Brevundimonas</i>	,274*
Comet neutre (OTM)	<i>Paenibacillus</i>	,264*
	<i>Enterococcus</i>	,288*
	<b>Famílies</b>	
	<i>Burkholderiaceae</i>	0,378**
	<i>Comamonadaceae</i>	0,264*
	<b>Gèneres</b>	
	<i>Ralstonia</i>	0,282*
<i>Cupriavidus</i>	0,378**	

\*p-valor < 0,05; \*\*p-valor < 0,01

Els resultats indiquen que l'estrès oxidatiu mesurat en sORP correlaciona de forma positiva amb dos gèneres de la família *Bradyrhizobiaceae*, *Oligotropha* i *Rhodopseudomonas*, i amb el gènere *Megasphaera* de la família *Veillonellaceae*. Aquests grups bacterians desenvolupen una activitat oxidasa a través, per exemple, d'enzims com l'acyl-CoA deshidrogenasa que podrien provocar l'alliberament de ROS al medi, fet que es traduiria en un increment de l'estrès oxidatiu. (DuPlessis *et al.*, 1998; Imhoff, 2015; Meyer, 2015; Muñoz *et al.*, 2015). No obstant, un altre família que també presenta una correlació positiva, els *Paenibacillaceae*, i el seu gènere *Paenibacillus*, presenten una activitat catalasa moderada, contradictòria amb l'increment de l'estrès oxidatiu (Priest, 2015; Dixit *et al.*, 2018). La catalasa és un conegut



enzim antioxidant present en el plasma seminal que elimina el peròxid d'hidrogen del medi, reduint així l'estrès oxidatiu (Zini *et al.*, 1993, 2000). D'altra banda, el gènere *Brevundimonas* correlaciona de manera inversa amb l'sORP. És possible, per tant, que aquest gènere tingui efectes beneficiosos per a la salut seminal. De fet, aquest gènere també es caracteritza per presentar activitat catalasa però, sobretot, per alliberar carotenoides a l'ambient (Vancanneyt *et al.*, 2015). Els carotenoides són molècules amb propietat antioxidant reconeguda (Liu *et al.*, 2020). Si s'amplia l'estudi realitzant una comparativa entre grups, prenent el valor de sORP de 1,34 mV/10<sup>6</sup>espermatozoides/ml com a punt de tall per diferenciar els individus amb estres oxidatiu alterat (Agarwal *et al.*, 2019a), l'anàlisi de les dades mostra com els gèneres *Aerococcus* i *Megasphaera* es troben incrementats de forma molt significativa (test U de Mann-Whitney amb p-valor < 0,01) en individus amb sORP alterat, mentre que la presència de *Brevundimonas* és significativament major en el grup amb sORP normal.

L'estat de compactació de la cromatina espermàtica presenta una correlació negativa molt significativa amb la família *Paenibacillaceae*, concretament amb el seu gènere *Paenibacillus*. També s'observa amb *Bacillus* i *Ralstonia*. Aquests tres gèneres es troben en menor presència en aquells pacients en que el percentatge de cèl·lules positives en CMA3 ha superat el valor de tall del 35,5% i, per tant, presentaven compactació anòmala (Ribas-Maynou *et al.*, 2020). D'altra banda, l'estat de la cromatina presenta una correlació positiva amb *Sphingomonadaceae* i el seu gènere *Sphingomonas*, però de forma especialment significativa amb el gènere *Schaalia* (un *Actinomycetaceae*).

Respecte a la fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena simple, i d'acord amb els resultats observats per l'estrès oxidatiu, els resultats obtinguts per l'assaig TUNEL correlacionen negativament amb la família *Caulobacteraceae* i el seu gènere *Brevundimonas*. *Oligotropha*, en canvi, presenta correlació negativa amb TUNEL però positiva amb el sORP. En comparar dos grups d'individus, un amb baix i l'altre amb alt nivell de fragmentació ( $\geq 22,08\%$

d'espermatozoides amb fragmentació (Javed *et al.*, 2019)), s'observa com altres bacteris com *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Gemella* i *Paenibacillus* també es troben relacionats de manera inversa amb els resultats de TUNEL.

Per la seva banda, els resultats obtinguts en l'anàlisi del Comet alcalí mostren un major nombre de gèneres que correlacionen negativament amb la presència de trencaments de cadena simple: *Moraxella* (i la seva família), *Lactobacillus* (i la seva família), *Cutibacterium*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas* i *Enterococcus*. També s'observa una correlació, en aquest cas positiva, amb *Thermoanaerobacteriaceae*, *Murdochiella* i *Tepidanaerobacter*. En comparar dos grups d'individus, un amb baix i l'altre amb alt nivell de fragmentació (>45% d'espermatozoides amb fragmentació (Casanovas *et al.*, 2019)), la presència de *Moraxella* i *Sphingomonas* mostra diferències significatives, de manera que en individus amb fragmentació elevada, aquests dos gèneres es troben infrarepresentats.

Finalment, la fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena doble mesurada amb l'assaig Comet neutre presenta correlacions positives molt significatives amb la família *Burkholderiaceae* (i els seus gèneres *Ralstonia* i *Cupriavidus*) i més dèbils amb *Paenibacillaceae* (i el gènere *Paenibacillus*), *Enterococcaceae* (i el gènere *Enterococcus*), *Mobiluncus*, *Brevundimonas* i *Gemella*. Aquest últim gènere també es detecta de manera diferencial entre els grups de baixa i alta fragmentació, determinats a partir d'un punt de tall de 48% d'espermatozoides afectats (Casanovas *et al.*, 2019).

#### **4.5.5. Implicació dels bacteris en la infertilitat masculina**

El conjunt dels nostres resultats mostren que la microbiota seminal presenta una composició molt diversa, amb multitud de grups taxonòmics diferents. Un estudi pioner de la relació d'aquests bacteris amb els paràmetres seminals

associats a infertilitat masculina ens ha permès detectar alguns grups bacterians amb potencial per produir un efecte sobre la fertilitat masculina.

El filum bacterià més nombrós al líquid seminal és *Firmicutes*. Algunes de les seves famílies més representatives són bones candidates a presentar un rol en el manteniment o l'afectació de la capacitat fèrtil del pacient. Dins la família més abundant a les mostres seminals estudiades, *Peptoniphilaceae*, el gènere *Peptoniphilus* podria tenir un efecte negatiu sobre la motilitat espermàtica progressiva. La viscositat seminal també sembla presentar una relació amb el gènere *Finegoldia*, no obstant, totes les correlacions trobades amb altres famílies i gèneres bacterians (*Comamonadaceae*, *Megasphaera*, *Ralstonia*, *Schaalia*, entre d'altres) han resultat de caràcter negatiu, pel que possiblement, un medi més líquid afavoriria un millor creixement en aquests bacteris. Un medi líquid facilitaria la motilitat de les espècies mòbils, afavorint l'obtenció de nutrients i permetent així la seva proliferació. A més, alguns d'aquests gèneres podrien actuar directament sobre la viscositat del medi a través de la producció d'àcids o enzims hidrolases, que actuarien sobre el proteïnoma del líquid seminal afavorint la seva líquüefacció (Kershaw-Young *et al.*, 2013; da Fonseca Junior *et al.*, 2020; Rateb, 2021).

De tots els bacteris que conformen el filum *Firmicutes*, els que presenten una major probabilitat de tenir una relació directa amb la fertilitat serien el grup dels *Bacilli*. Les famílies *Bacillaceae* i *Paenibacillaceae* o alguns dels seus gèneres apareixen amb freqüència com a factors de mala qualitat espermàtica, amb correlacions negatives amb la morfologia, la concentració, la fragmentació d'ADN de doble cadena i l'estrès oxidatiu. Un cas particular és el gènere *Lactobacillus*. La bibliografia mostra resultats contradictoris respecte el paper d'aquest gènere en la qualitat seminal. Alguns autors han descrit una disminució de *Lactobacillus* en homes infèrtils amb problemes de motilitat espermàtica o hiperviscositat seminal viscositat (Weng *et al.*, 2014; Mändar *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018; Baud *et al.*, 2019). Per contra, altres autors troben un increment d'aquest gènere en pacients

astenozoospèrmics i azoospèrmics (Hou *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). En el present estudi, s'ha observat que mostres amb una elevada abundància relativa d'aquests bacteris presentaven una reducció de la fragmentació d'ADN espermàtic de cadena simple. Una possible explicació d'aquest efecte protector de *Lactobacillus* seria la producció de SCFA característica d'aquests bacteris. Aquests SCFA podrien presentar un efecte antioxidant, a través de la prevenció de la peroxidació lipídica de la membrana espermàtica (Barbonetti *et al.*, 2011; Markowiak-Kopeć i Ślizewska, 2020), fenomen que provoca porus a la membrana cel·lular, debilitant-la i fent-la més permeable a molècules com les ROS, afavorint la seva arribada al nucli i el dany a l'ADN. L'efecte final dels SCFA seria una reducció de l'estrès oxidatiu sobre el material genètic de l'espermatozoide.

Entre els *Firmicutes* que semblen tenir un efecte negatiu sobre la integritat de l'ADN espermàtic hi trobem *Megasphaera*. Aquest gènere de la família *Veillonellaceae*, es troba incrementat en mostres amb elevat estrès oxidatiu i, en general, en individus infèrtils. La seva producció d'acyl-CoA deshidrogenases (DuPlessis *et al.*, 1998) podria incrementar els nivells de ROS en el plasma seminal i augmentar el risc de dany a l'ADN espermàtic. Finalment, s'observa la presència incrementada d'*Enterococcus* en mostres amb un grau elevat de fragmentació d'ADN de cadena simple i doble. Aquests resultats concorden amb els publicats per altres grups d'investigació en casos de bacteriospèrmia o assaigs *in vitro* (Zeyad *et al.*, 2018; Duracka *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Malgrat els *Firmicutes* són la família més abundant, el filum *Proteobacteria* sembla ser el que presenta més relació amb els paràmetres seminals i espermàtics, amb un efecte majoritàriament beneficiós. El gènere *Moraxella* i la seva família, amb gran presència a les mostres estudiades, s'ha trobat en elevada proporció principalment en mostres de pacients amb fertilitat provada. Aquestes proporcions elevades, a més, s'han observat en aquelles mostres que presentaven nivells baixos de fragmentació d'ADN de cadena

simple i millor morfologia espermàtica. Aquest grup bacterià és comú en la microbiota de mucoses, especialment en tracte respiratori i auditiu i només unes poques espècies són patogèniques. De fet, diferents autors han destacat que colònies estables de *Moraxella* es troben associades a bona salut tant a les vies respiratòries com al tracte intestinal i que és la seva desregulació la que produeix efectes patogènics (Clemente *et al.*, 2012; Biesbroek *et al.*, 2014; Bosch *et al.*, 2017; van den Munckhof *et al.*, 2020).

La família *Burkholdiaceae*, principalment representada per *Ralstonia*, es relaciona, segons les nostres dades, amb una bona morfologia espermàtica i una bona compactació de l'ADN, suggerint una efecte beneficiós. Tal com s'ha comentat anteriorment, malgrat *Ralstonia* també es troba correlacionada negativament amb la concentració espermàtica, es correlaciona de manera positiva amb el volum. Concentració i volum són paràmetres inversament relacionats, doncs a major volum menor pot ser la concentració cel·lular. No obstant, tant la família *Burkholdiaceae* com la *Comamonadaceae*, genèticament emparentades entre sí, es troben incrementades en pacients amb alt grau de fragmentació d'ADN de doble cadena. Yang i col·laboradors, en analitzar el microbioma de pacients astenozoospermics, identificaren una presència abundant de *Ralstonia* (Yang *et al.*, 2020), suggerint una relació perjudicial entre aquest gènere i la motilitat espermàtica. La falta de consens en aquests dos estudis fa necessari incrementar la recerca enfocada en l'efecte d'aquest gènere bacterià sobre els paràmetres seminals.

Un altre *Proteobacteria* amb resultats potencialment beneficiosos és *Brevundimonas*, un gènere que s'ha observat amb més abundància en individus amb baix estrès oxidatiu, alta motilitat espermàtica progressiva i nivells baixos de fragmentació d'ADN espermàtic de cadena simple. Tots aquests paràmetres estan intrínsecament relacionats entre ells i suggereixen l'existència d'un mecanisme causa-efecte (Taha *et al.*, 2012; Peluso *et al.*, 2013; Ribas-Maynou i Benet, 2019). Com s'ha comentat prèviament,

l'activitat catalasa i la producció de carotenoides per part de *Brevundimonas* podria contribuir a la reducció de l'estrès oxidatiu seminal (Vancanneyt *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020), reduint així el dany que aquest provoca sobre la membrana cel·lular per peroxidació lipídica. Si aquesta peroxidació succeís, es produiria dany extensiu sobre l'ADN i la fragilitat de la membrana podria afectar a la motilitat espermàtica (Ribas-Maynou i Benet, 2019). Aquesta podria ser una explicació al fet que s'hagi observat una forta relació negativa entre la motilitat progressiva i el dany genètic oxidatiu (fragmentació de cadena simple) (Aitken i De Iuliis, 2010; Belloc *et al.*, 2014; Evgeni *et al.*, 2015). Un resultat similar el trobem en *Flavobacterium*, l'únic gènere bacterià del filum *Bacteroidetes* que, segons els nostres anàlisis, presenta una relació potencial amb la fertilitat. Aquests bacteris es troben amb més abundància en individus amb nivells baixos de fragmentació d'ADN de cadena simple i una alta motilitat espermàtica progressiva; i s'ha vist que freqüentment presenten activitat catalasa i producció de carotenoides (Bernardet i Bowman, 2015), igual que *Brevundimonas*.

És important també assenyalar les aparents contradiccions que hem pogut observar, respecte l'efecte de determinats grups bacterians *Proteobacteria*, sobre marcadors de la fertilitat. La família *Sphingomonadaceae*, per exemple, presenta correlació negativa amb els nivells de fragmentació d'ADN espermàtic de cadena simple però negativa amb la motilitat espermàtica i el grau de compactació de la cromatina. La família *Bradyrhizobiaceae*, per la seva banda, es troba incrementat en pacients infèrtils amb estrès oxidatiu però correlacionat negativament amb els nivells de fragmentació d'ADN valorats per TUNEL. Tot això ens indica la necessitat de continuar estudiant el microbioma seminal, incrementant el número d'estudis i el número de mostres analitzades per tal de conèixer millor el possible impacte que podrien tenir aquestes dues famílies sobre la fertilitat masculina.

Finalment, dins el filum *Actinobacteria* destaca la relació de *Gardnerella* i la seva família *Bifidobacteriaceae* amb una millor motilitat espermàtica, tant

total com progressiva, ja observada prèviament per Weng i col·laboradors (Weng *et al.*, 2014). El seu efecte com a probiòtic antioxidant pot ser el responsable de la seva relació amb la motilitat, com ja s'ha comentat amb anterioritat. Pel que fa a *Propionibacteriaceae*, tot i trobar-se incrementat en pacients infèrtils, també s'ha observat una relació amb la motilitat espermàtica i baixos nivells de fragmentació d'ADN de cadena simple. Per contra, la família *Actinomycetaceae* sembla incrementada en pacients amb mala compactació de la cromatina espermàtica i alts nivells de fragmentació d'ADN de doble cadena. De fet, s'ha demostrat que els *Actinomycetaceae* són productors d'isoprenoides (Kawasaki *et al.*, 2003), i hi ha evidències de l'efecte d'aquests isoprenoides sobre la integritat de l'ADN en cèl·lules tumorals (Mo i Elson, 1999). Sembla que, en concentracions adequades, aquestes substàncies ocasionen fragmentació a l'ADN, induint apoptosi en el model cel·lular emprat per aquests autors. És possible, doncs, que la relació d'aquest grup bacterià amb la presència de fragmentació d'ADN de cadena doble pugui ser mediada pels isoprenoides que produeixen. Es necessiten més estudis per acabar de determinar aquesta possibilitat.

Cal tenir molt en compte que, actualment, les limitacions metodològiques afecten a la precisió dels estudis de la microbiota. La metodologia de seqüenciació, el fragment diana a estudiar, les diferents estratègies d'anàlisi i altres variables fan que els resultats puguin variar entre grups d'investigació. De fet, prova d'això són les diferències observades entre els diferents estudis realitzats sobre la microbiota seminal en quant a determinació d'espècies presents i efectes d'aquestes sobre paràmetres seminals. Per tot això, es fa necessari plantejar estudis multiplataforma que permetin augmentar el nombre mostral, de manera que es pugui obtenir informació contrastada i rellevant sobre el paper de la microbiota.

De moment, però, els nostres resultats i els d'altres grups d'investigació aporten evidències sobre el paper de la microbiota seminal en la fertilitat masculina. Tot i tenir una baixa biomassa, alguns d'aquests bacteris mostren

una relació consistent amb la seva activitat metabòlica o enzimàtica, a més de correlacionar simultàniament amb diversos paràmetres que ja es troben interrelacionats, com l'estrès oxidatiu, la fragmentació d'ADN i la motilitat espermàtica. Els mecanismes a través dels quals interaccionen amb aquests paràmetres seminals i espermàtics són encara desconeguts en la majoria dels casos. Caldran estudis futurs dirigits a determinar l'efecte real de cadascun dels bacteris identificats i les possibles aplicacions clíniques, tant diagnòstiques com de tractaments basats en probiòtics, que puguin millorar la qualitat seminal i les expectatives d'embaràs.





## **5. CONCLUSIONS**



## **BLOC 1: ESTUDI DE PARÀMETRES SEMINALS I ESPERMÀTICS**

1. L'anàlisi del potencial oxidant-reductor MiOXSYS ha detectat una afectació del pH en la reproductibilitat, suggerint un efecte d'aquest paràmetre sobre les lectures del dispositiu.
2. S'ha trobat una relació negativa entre els valors de potencial oxidant-reductor seminal i l'estat de compactació de la cromatina espermàtica, així com amb la qualitat seminal.
3. El coneixement combinat de la fragmentació d'ADN espermàtic, l'estat de compactació de la cromatina i el potencial oxidant-reductor aporten informació clínica rellevant per a la manipulació de mostres seminals en processos de reproducció assistida.

## **BLOC 2: MICROBIOTA SEMINAL I RELACIÓ AMB LA FERTILITAT**

4. L'anàlisi de la microbiota seminal a partir de l'amplificació del gen ribosomal *16S* complet és una metodologia que permet classificar amb precisió els gèneres i famílies bacterianes més abundants del plasma seminal, i fins i tot identificar gèneres no descrits anteriorment amb l'amplificació de regions específiques del gen.
5. L'anàlisi metagenòmica emprant el *software* Dragen Metagenomics ha resultat l'estratègia més adequada per a l'anàlisi bioinformàtica de les dades extretes del seqüenciador MiSeq d'Illumina per a fragments aleatoris del gen *16S* complet.
6. L'anàlisi metagenòmica emprant el *software* EPI2ME 16S Workflow ha resultat l'estratègia més adequada per a l'anàlisi bioinformàtica de les dades extretes del seqüenciador MinION d'Oxford Nanopore Technologies per a fragments aleatoris del gen *16S* complet.

7. La plataforma Illumina identifica l'abundància relativa del bacteris presents a la *mock community* amb més precisió i inclou menys errors de classificació que la plataforma Oxford Nanopore Technologies.
8. Tal i com s'ha descrit en altres poblacions, la microbiota seminal trobada en aquest estudi es compon principalment de bacteris que pertanyen a quatre filums: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*.
9. En població mediterrània, els gèneres bacterians més abundants al semen són *Fingoldia*, *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Moraxella*, *Prevotella*, *Ezakiella*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ralstonia* i *Dialister*.
10. *Moraxella*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Ralstonia*, *Neisseria*, *Cutibacterium*, *Lactobacillus* i *Filifactor* són gèneres associats a una bona qualitat seminal i espermàtica.
11. *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterococcus*, *Megasphaera* i *Schaalia* són gèneres associats a una qualitat seminal i espermàtica alterada.
12. El filum *Proteobacteria* és el que s'associa més freqüentment amb una millor preservació de la integritat de l'ADN espermàtic.
13. Gèneres com *Brevundimonas* o *Flavobacterium*, gràcies a la seva activitat catalasa i producció de carotenoides, poden aportar efectes antioxidants que millorin l'estrès oxidatiu, la fragmentació de l'ADN espermàtic i la motilitat espermàtica.

## **6. BIBLIOGRAFIA**



## A

---

- Adler ID. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 1996;**352**:169-172. Elsevier. doi:10.1016/0027-5107(95)00223-5.
- Agarwal A, Arafa M, Chandrakumar R, Majzoub A, AlSaid S, Elbardisi H. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method. *Andrology* [Internet] 2017a;**5**:939-945. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/andr.12395.
- Agarwal A, Bui AD. Oxidation-Reduction Potential Methodology Using the MiOXSYS System. *Oxid Antioxidants Impact Oxidative Status Male Reprod* [Internet] 2019;, p. 217-224. Elsevier Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128125014000201>. doi:10.1016/B978-0-12-812501-4.00020-1.
- Agarwal A, Cho CL, Esteves SC, Majzoub A. Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Transl Androl Urol* [Internet] 2017b;**6**:S695-S696. AME Publishing Company. doi:10.21037/tau.2017.05.40.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2015;**13**:37. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12958-015-0032-1.
- Agarwal A, Panner Selvam M, Arafa M, Okada H, Homa S, Killeen A, Balaban B, Saleh R, Armagan A, Roychoudhury S, *et al*. Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian J Androl* 2019a;**21**:565-569. Wolters Kluwer Medknow Publications. doi:10.4103/aja.aja\_5\_19.
- Agarwal A, Parekh N, Selvam MKP, Henkel R, Shah R, Homa ST, Ramasamy R, Ko E, Tremellen K, Esteves S, *et al*. Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J Men's Heal* [Internet] 2019b;**37**:296-312. Korean Society for Sexual Medicine and Andrology.



doi:10.5534/wjmh.190055.

- Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, Majzoub A, Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2017c;**34**:48-57. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.rbmo.2016.10.008.
- Agarwal A, Sharma R, Roychoudhury S, Plessis S Du, Sabanegh E. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril* [Internet] 2016;**106**:566-573.e10. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.05.013.
- Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 2017;**84**:1039-1052. John Wiley and Sons Inc. doi:10.1002/mrd.22871.
- Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King B V. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl* [Internet] 2005;**28**:171-179. *Int J Androl*. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00531.x.
- Aitken RJ, Iuliis GN De. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:3-13. doi:10.1093/molehr/gap059.
- Aitken RJ, Iuliis GN De, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* [Internet] 2009;**32**:46-56. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* [Internet] 2001;**122**:497-506. Journals of Reproduction and Fertility Ltd. doi:10.1530/rep.o.1220497.
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Duin M Van. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* [Internet] 1995;**108**:2017-2025. *J Cell Sci*. doi:10.1242/jcs.108.5.2017.

- Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon - Not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* [Internet] 2003;**518**:. p. 85-98. Kluwer Academic/Plenum Publishers. doi:10.1007/978-1-4419-9190-4\_8.
- Ajayi AF, Akhigbe RE. The physiology of male reproduction: Impact of drugs and their abuse on male fertility. *Andrologia* [Internet] 2020;**52**:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.13672.
- Alhaj HW, Li Z, Shan T, Dai P, Zhu P, Li Y, Alsiddig MA, Abdelghani E, Li C. Effects of dietary sodium butyrate on reproduction in adult breeder roosters. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2018;**196**:111-119. Anim Reprod Sci. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.07.002.
- Alkhayal A, San Gabriel M, Zeidan K, Alrabeeah K, Noel D, McGraw R, Bissonnette F, Kadoch IJ, Zini A. Sperm DNA and chromatin integrity in semen samples used for intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2013;**30**:1519-1524. J Assist Reprod Genet. doi:10.1007/s10815-013-0101-3.
- Allai L, Druart X, Öztürk M, BenMoula A, Nasser B, Amiri B El. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2016;**175**:1-9. Anim Reprod Sci. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.09.013.
- Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, Koci M, Ballou A, Mendoza M, Ali R, *et al.* A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol* [Internet] 2017;**17**:194. BMC Microbiol. doi:10.1186/s12866-017-1101-8.
- Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl* [Internet] 2016;**18**:179-181. Medknow Publications. doi:10.4103/1008-682X.172640.

- Altmäe S, Franasiak JM, Mändar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nat Rev Urol* [Internet] 2019;**16**:703-721. Nature Research. doi:10.1038/s41585-019-0250-y.
- Altveş S, Yildiz H, Vural H. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Biosci Microbiota, Food Heal* [Internet] 2020;**39**:23-32. BMFH Press. doi:10.12938/bmfh.19-023.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* [Internet] 2013;**146**:. Reproduction. doi:10.1530/REP-13-0178.
- Amato V, Papaleo E, Pasciuta R, Viganò P, Ferrarese R, Clementi N, Sanchez AM, Quaranta L, Burioni R, Ambrosi A, *et al.* Differential Composition of Vaginal Microbiome, but Not of Seminal Microbiome, Is Associated With Successful Intrauterine Insemination in Couples With Idiopathic Infertility: A Prospective Observational Study. *Open Forum Infect Dis* [Internet] 2020;**7**:. Oxford University Press. doi:10.1093/ofid/ofz525.
- Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J Microbiol* [Internet] 2016;**56**:394-404. Springer India. doi:10.1007/s12088-016-0606-4.
- Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review: Invited Review. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* [Internet] 2010;**50**:8-20. Aust N Z J Obstet Gynaecol. doi:10.1111/j.1479-828X.2009.01119.x.
- Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010; [Online] Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ansari MM, Vyas S, Sawal RK, Ravi SK, Patil N V., Jan MH. Effect of different proteolytic enzymes on liquefaction of semen of dromedary camel. *Emirates J Food Agric* 2018;**30**:335-340. doi:10.9755/ejfa.2018.v30.i4.1670.

- Arafa M, Agarwal A, Said S Al, Majzoub A, Sharma R, Bjugstad KB, AlRumaihi K, Elbardisi H. Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation–reduction potential. *Andrologia* 2018;**50**:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.12881.
- Araki S, Shirahata A. Vitamin k deficiency bleeding in infancy. *Nutrients* [Internet] 2020;**12**:. MDPI AG. doi:10.3390/nu12030780.
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* [Internet] 2009;**19**:1338-1349. *Genome Res*. doi:10.1101/gr.094953.109.
- Atshan M, Kakavand K, Hosseini SH, Sadighi Gilani MA, Mohseni Meybodi A, Sabbaghian M. Evaluation of sperm DNA fragmentation and chromatin structure in infertile men with immotile short-tail sperm defect. *Andrologia* [Internet] 2020;**52**:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.13445.
- Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem Rev* 2008 **73** [Internet] 2008;**7**:407-429. Springer. doi:10.1007/S1101-008-9095-3.
- Aydemir B, Onaran I, Ali İ, Kiziler R, Alici B, Can Akyolcu M. The Influence of Oxidative Damage on Viscosity of Seminal Fluid in Infertile Men. *J Androl* 2008;**29**:4146. doi:10.2164/jandrol.107.003046.

## B

---

- Bajerski F, Bürger A, Glasmacher B, Keller ERJ, Müller K, Mühldorfer K, Nagel M, Rüdell H, Müller T, Schenkel J, *et al*. Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet] 2020;**104**:131-144. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s00253-019-10242-1.

- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B. Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* [Internet] 1991;**30**:175-181. *Biochemistry*. doi:10.1021/bio0215a026.
- Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. *Bacteroides ureolyticus* in men consulting for infertility. *Andrologia* [Internet] 1994;**26**:35-38. *Andrologia*. doi:10.1111/j.1439-0272.1994.tb00751.x.
- Barbonetti A, Cinque B, Vassallo MRC, Mineo S, Francavilla S, Cifone MG, Francavilla F. Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. *Fertil Steril* [Internet] 2011;**95**:2485-2488. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.066.
- Bari M, Battista N, Pirazzi V, Maccarrone M. The manifold actions of endocannabinoids on female and male reproductive events. *Front Biosci* [Internet] 2011;**16**:498-516. *Front Biosci (Landmark Ed)*. doi:10.2741/3701.
- Barratt CLRR, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, Boer P de, Kvist U, Lewis SEMM, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L, *et al*. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod* [Internet] 2010;**25**:824-838. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/dep465.
- Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Front Microbiol* [Internet] 2019;**10**:. *Frontiers Media S.A.* doi:10.3389/fmicb.2019.00234.
- Bayasgalan G, Naranbat D, Tsedmaa B, Tsogmaa B, Sukhee D, Amarjargal O, Lhagvasuren T, Radnaabazar J, Rowe PJ. Clinical patterns and major causes of infertility in Mongolia. *J Obstet Gynaecol Res* [Internet] 2004;**30**:386-393. *J Obstet Gynaecol Res*. doi:10.1111/j.1447-0756.2004.00217.x.
- Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* [Internet] 2017;**46**:562-576. *Cell Press*. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.

- Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril* [Internet] 2014;**101**:1588-1593. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.02.006.
- Bernardet J-F, Bowman JP. Flavobacterium. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015; p. 1-75. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00312>. doi:10.1002/9781118960608.GBM00312.
- Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF, Song L, Chang HC, Wang XR. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med* [Internet] 2004;**61**:999-1005. *Occup Environ Med*. doi:10.1136/oem.2004.014597.
- Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, Cammarota G. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet] 2016;**20**:4742-4749.
- Biesbroek G, Tsvitshivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJF, Bogaert D. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] 2014;**190**:1283-1292. *Am J Respir Crit Care Med*. doi:10.1164/rccm.201407-1240OC.
- Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol* [Internet] 2017;**14**:470-485. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrurol.2017.69.
- Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Sakkas D. Sperm decondensation during fertilisation in the mouse: Presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. *Zygote* [Internet] 2000;**8**:197-202. Cambridge University Press. doi:10.1017/S0967199400000988.

- Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, Pederzoli F, Cazzaniga W, Chierigo F, Deho F, Montanari E, Montorsi F, Salonia A. Heavy cigarette smoking and alcohol consumption are associated with impaired sperm parameters in primary infertile men. *Asian J Androl* [Internet] 2019;**21**:478-485. Wolters Kluwer Medknow Publications. doi:10.4103/aja.aja\_110\_18.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* [Internet] 2007;**22**:1506-1512. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/dem046.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 2012 101 [Internet] 2013;**10**:57-59. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nmeth.2276.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, *et al*. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* [Internet] 2019;**37**:852-857. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
- Bosch AATM, Steenhuijsen Piters WAA de, Houten MA van, Chu MLJN, Biesbroek G, Kool J, Pernet P, Groot P-KCM de, Eijkemans MJC, Keijser BJF, *et al*. Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] 2017;**196**:1582-1590. Am J Respir Crit Care Med. doi:10.1164/rccm.201703-0554OC.
- Brandão P, Gonçalves-Henriques M. The Impact of Female Genital Microbiota on Fertility and Assisted Reproductive Treatments. *J Fam Reprod Heal* [Internet] 2020;**14**:131. Knowledge E. doi:10.18502/jfrh.v14i3.4666.
- Bravo PW, Ccallo M, Garnica J. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Rumin Res* [Internet] 2000;**38**:91-95. Small Rumin Res. doi:10.1016/S0921-4488(00)00142-5.

Brewer L, Corzett M, Lau EY, Balhorn R. Dynamics of Protamine 1 Binding to Single DNA Molecules. *J Biol Chem* [Internet] 2003;278:42403-42408. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M303610200.

Brucker S De, Drakopoulos P, Dhooghe E, Geeter J De, Uvin V, Santos-Ribeiro S, Michielsen D, Tournaye H, Brucker M De. The effect of cigarette smoking on the semen parameters of infertile men. *Gynecol Endocrinol* 2020;36:1127-1130. Taylor and Francis Ltd. doi:10.1080/09513590.2020.1775195.

## C

---

Campisciano G, Florian F, D'Eustacchio A, Stanković D, Ricci G, Seta F De, Comar M. Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol* [Internet] 2017;232:1681-1688. Wiley-Liss Inc. doi:10.1002/jcp.25806.

Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, Jimenez-Macedo AR, Hortal O, Benet J, Carrera J, García-Peiró A. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil Steril* [Internet] 2019;111:699-707.e1. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.11.035.

Castelino M, Eyre S, Moat J, Fox G, Martin P, Ho P, Upton M, Barton A. Optimisation of methods for bacterial skin microbiome investigation: primer selection and comparison of the 454 versus MiSeq platform. *BMC Microbiol* [Internet] 2017;17:. BioMed Central. doi:10.1186/S12866-017-0927-4.

Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P. Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J Androl* [Internet] 1994;15:608-613. *J Androl*. doi:10.1002/j.1939-4640.1994.tb00507.x.



- Chatterjee R, Haines GA, Perera DMD, Goldstone A, Morris ID. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* [Internet] 2000;**15**:762-766. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/15.4.762.
- Chen H, Luo T, Chen T, Wang G. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. *Exp Ther Med* [Internet] 2018;**15**:2884-2890. Spandidos Publications. doi:10.3892/etm.2018.5778.
- Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol* [Internet] 2018;**16**:21-34. Arab Association of Urology. doi:10.1016/j.aju.2017.11.002.
- Churikov D, Siino J, Svetlova M, Zhang K, Gineitis A, Morton Bradbury E, Zalensky A. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* [Internet] 2004;**84**:745-756. Academic Press. doi:10.1016/j.ygeno.2004.06.001.
- Chyra-Jach D, Kaletka Z, Dobrakowski M, Machoń-Grecka A, Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A. The Associations between Infertility and Antioxidants, Proinflammatory Cytokines, and Chemokines. *Oxid Med Cell Longev* [Internet] 2018;**2018**:. Hindawi Limited. doi:10.1155/2018/8354747.
- Clarke G, Sandhu K V., Griffin BT, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. In France CP, editor. *Pharmacol Rev* [Internet] 2019;**71**:198-224. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. doi:10.1124/pr.118.015768.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* [Internet] 2012;**148**:1258-1270. Cell. doi:10.1016/j.cell.2012.01.035.

Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, Driscoll AO, Stanton C, Cotter PD, Claesson MJ. Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis. *PLoS One* [Internet] 2016;**11**:. Public Library of Science. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0148028.

Collins MD, Falsen E. *Aerococcus*. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;, p. 1-7. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbmo0581>. doi:10.1002/9781118960608.gbmo0581.

Colt JS, Blair A. Parental occupational exposures and risk of childhood cancer. *Environ Health Perspect* 1998;**106**:, p. 909-925. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. doi:10.1289/ehp.98106909.

## D

---

Danis RB, Samplaski MK. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Curr Urol Rep* [Internet] 2019;**20**:. Current Medicine Group LLC 1. doi:10.1007/s11934-019-0911-7.

Danneskiold-Samsøe NB, Dias de Freitas Queiroz Barros H, Santos R, Bicas JL, Cazarin CBB, Madsen L, Kristiansen K, Pastore GM, Brix S, Maróstica Júnior MR. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res Int* [Internet] 2019;**115**:23-31. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.foodres.2018.07.043.

Dijkwel PA, Hamlin JL. Origins of Replication and the Nuclear Matrix: The DHFR Domain as a Paradigm. *Int Rev Cytol* [Internet] 1996;**162**:, p. 455-484. *Int Rev Cytol*. doi:10.1016/S0074-7696(08)61236-X.

Diop K, Raoult D, Bretelle F, Fenollar F. "Ezakiella massiliensis" sp. nov., a new bacterial species isolated from human female genital tract. *New Microbes New Infect* 2017;**15**:16-17. Elsevier. doi:10.1016/j.NMNI.2016.09.011.

Divya V, Girish Kumar V, Nandi S, Ramchandra SG. Dynamics of Spermatogenesis. *Annu Res Rev Biol* [Internet] 2014;**4**:38-50. Sciencedomain International. doi:10.9734/ARRB/2014/4289.

- Dixit R, Agrawal L, Singh SP, Prateeksha, Singh PC, Prasad V, Chauhan PS. Paenibacillus lentimorbus induces autophagy for protecting tomato from Sclerotium rolfsii infection. *Microbiol Res* [Internet] 2018;**215**:164-174. *Microbiol Res*. doi:10.1016/j.micres.2018.07.008.
- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Balleascà JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: Correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytom Part A* [Internet] 2007;**71**:1011-1018. *Cytometry A*. doi:10.1002/cyto.a.20484.
- Dominianni C, Wu J, Hayes RB, Ahn J. Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection. *BMC Microbiol* [Internet] 2014;**14**:103. BioMed Central. doi:10.1186/1471-2180-14-103.
- DuPlessis ER, Pellett J, Stankovich MT, Thorpe C. Oxidase activity of the acyl-CoA dehydrogenases. *Biochemistry* [Internet] 1998;**37**:10469-10477. *Biochemistry*. doi:10.1021/bi980767s.
- Duracka M, Lukac N, Kacaniova M, Kantor A, Hleba L, Ondruska L, Tvrda E. Antibiotics Versus Natural Biomolecules: The Case of In Vitro Induced Bacteriospermia by Enterococcus Faecalis in Rabbit Semen. *Molecules* [Internet] 2019;**24**:. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi:10.3390/molecules24234329.

## E

---

- Eisenberg T, Glaeser SP, Blom J, Kämpfer P. Leptotrichiaceae. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2018;, p. 1-9. Wiley Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.fb00155.pub2>. doi:10.1002/9781118960608.fb00155.pub2.
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with Chlamydia trachomatis lipopolysaccharide. *Hum Reprod* [Internet] 2005;**20**:2601-2607. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/dei082.

- Ellis JL, Karl JP, Oliverio AM, Fu X, Soares JW, Wolfe BE, Hernandez CJ, Mason JB, Booth SL. Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes* [Internet] 2021;**13**:1-16. Gut Microbes. doi:10.1080/19490976.2021.1887721.
- Encyclopedia Britannica. Semen. *Encycl Br* [Internet] 2021; Available from: <https://www.britannica.com/science/semen>.
- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res* [Internet] 2015;**37**:223-236. Alcohol Res.
- Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, Garrido N, Calderón G. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2011;**23**:704-710. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.rbmo.2011.07.010.
- Esquerré-Lamare C, Walschaerts M, Chansel Debordeaux L, Moreau J, Bretelle F, Isus F, Karsenty G, Monteil L, Perrin J, Papaxanthos-Roche A, *et al*. Sperm aneuploidy and DNA fragmentation in unexplained recurrent pregnancy loss: A multicenter case-control study. *Basic Clin Androl* [Internet] 2018;**28**. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12610-018-0070-6.
- 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* [Internet] 2002;**23**:25-43. American Society of Andrology Inc. doi:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x.
- Evgeni E, Lymberopoulos G, Touloupidis S, Asimakopoulos B. Sperm nuclear DNA fragmentation and its association with semen quality in Greek men. *Andrologia* [Internet] 2015;**47**:1166-1174. Andrologia. doi:10.1111/and.12398.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res* [Internet] 1998;**8**:175-185. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/gr.8.3.175.

Ezaki T. Finegoldia. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;; p. 1-3.  
American Cancer Society Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00713>.  
doi:10.1002/9781118960608.gbm00713.

## F

---

- Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research* [Internet] 2019;**8**:. F1000 Research Ltd. doi:10.12688/f1000research.17076.1.
- Farahani L, Tharakan T, Yap T, Ramsay JW, Jayasena CN, Minhas S. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* [Internet] 2021;**9**:115-144. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/andr.12886.
- Fedder J, Ellerman-Eriksen S. Effect of cytokines on sperm motility and ionophore-stimulated acrosome reaction. *Arch Androl* [Internet] 1995;**35**:173-185. Informa Healthcare. doi:10.3109/01485019508987870.
- Fettweis JM, Serrano MG, Girerd PH, Jefferson KK, Buck GA. A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing. *Chem Biodivers* [Internet] 2012;**9**:965-976. NIH Public Access. doi:10.1002/cbdv.201100359.
- Flint M. Relationship between semen viscosity and male genital tract infections By. *Sci York* 2012;
- Flint M, Plessis S du, Menkveld R. Revisiting the assessment of semen viscosity and its relationship to leucocytospermia. *Andrologia* [Internet] 2014;**46**:837-841. doi:10.1111/and.12157.
- Fonseca Junior AM da, Gaita V, Argumedo DR, Castro LS de, Losano JD de A, Ferreira Leite R, Nichi M, Assumpção MEO d'Ávila, Araújo DR de, Neves AAR, et al. Changes in fertilization medium viscosity using hyaluronic acid impact bull sperm motility and acrosome status. *Reprod Domest Anim* [Internet] 2020;**55**:974-983. Reprod Domest Anim.

doi:10.1111/rda.13739.

- Fouhy F, Clooney AG, Stanton C, Claesson MJ, Cotter PD. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* [Internet] 2016;**16**:. BioMed Central. doi:10.1186/S12866-016-0738-Z.
- Fraczek M, Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: Potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet] 2015;**53**:201-217. Via Medica. doi:10.5603/FHC.a2015.0019.
- Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci* [Internet] 2007;**12**:2890-2911.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* [Internet] 2000;**45**:215-225. Taylor and Francis Inc. doi:10.1080/01485010050193995.
- Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* [Internet] 2017;**20**:145-155. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nn.4476.

## G

---

- Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UME, Zhong X, Koenig SSK, Fu L, Ma Z, Zhou X, *et al*. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Sci Transl Med* [Internet] 2012;**4**:132ra52-132ra52. NIH Public Access. doi:10.1126/scitranslmed.3003605.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* [Internet] 2011a;**95**:105-109. Fertil Steril. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.053.

- García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Amengual MJ, López-Fernández C, Gosálvez J, Benet J. Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J Androl* [Internet] 2012;**33**:361-367. *J Androl*. doi:10.2164/jandrol.111.013722.
- García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosálvez J, Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* [Internet] 2011;**34**:546-553. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x.
- García-Segura S, Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Benet J. Anàlisi de fragmentació del DNA espermàtic mitjançant l'assaig Comet alcalí i neutre: aplicació d'un software d'anàlisi computeritzada. In Oliva R, Ribes E, editors. *Biol la Reprod* 2017;**15**; p. 61-66. Societat Catalana de Biologia: Barcelona.
- García-Segura S, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, García-Peiró A, Castel AB, Benet J, Oliver-Bonet M. Relationship of Seminal Oxidation-Reduction Potential with Sperm DNA Integrity and pH in Idiopathic Infertile Patients. *Biology (Basel)* [Internet] 2020;**9**:1-12. *Biology (Basel)*. doi:10.3390/biology9090262.
- Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (80- )* [Internet] 2016;**352**:539-544. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.aad9378.
- GitHub - DeniRibicic/q2ONT: Bash pipeline for analysis of ONT full-length 16S sequences in QIIME2 2020; Available from: <https://github.com/DeniRibicic/q2ONT>.
- Glozheni O, Hambartsoumian E, Strohmer H, Petrovskaya E, Tishkevich O, Bogaerts K, Wyns C, Balic D, Antonova I, Pelekanos M, *et al*. ART in Europe, 2016: results generated from European registries by ESHRE†. *Hum Reprod Open* [Internet] 2020;**2020**:1-17. doi:10.1093/hropen/hoaa032.

- Gomendio M, Roldan ERS. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol* [Internet] 2008;52:439-447. *Int J Dev Biol*. doi:10.1387/ijdb.o82595mg.
- González S, Salazar N, Ruiz-Saavedra S, Gómez-Martín M, Los Reyes-Gavilán CG de, Gueimonde M. Long-Term Coffee Consumption is Associated with Fecal Microbial Composition in Humans. *Nutrients* [Internet] 2020;12:. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi:10.3390/nu12051287.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016 176 [Internet] 2016;17:333-351. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrg.2016.49.
- Gopinath D, Wie CC, Banerjee M, Thangavelu L, Kumar R P, Nallaswamy D, Botelho MG, Johnson NW. Compositional profile of mucosal bacteriome of smokers and smokeless tobacco users. *Clin Oral Investig* [Internet] 2021; Clin Oral Investig Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34436669/>. doi:10.1007/s00784-021-04137-7.
- Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz R, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis - their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* [Internet] 1992;1:. Spandidos Publications. doi:10.3892/ijo.1.6.639.
- Gosálvez J, Cortés-Gutierrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* [Internet] 2009;92:170-173. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.068.
- Graspeuntner S, Bohlmann MK, Gillmann K, Speer R, Kuenzel S, Mark H, Hoellen F, Lettau R, Griesinger G, König IR, *et al*. Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the



diagnosis of infectious infertility. In Dean D, editor. *PLoS One* [Internet] 2018;**13**:e0191047. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0191047.

Gu N-H, Zhao W-L, Wang G-S, Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2019;**17**:66. *Reprod Biol Endocrinol*. doi:10.1186/s12958-019-0510-y.

Gubert C, Kong G, Renoir T, Hannan AJ. Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* [Internet] 2020;**134**:104621. *Neurobiol Dis*. doi:10.1016/j.nbd.2019.104621.

Gülden E, Wong FS, Wen L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* [Internet] 2015;**159**:143-153. Academic Press Inc. doi:10.1016/j.clim.2015.05.013.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, *et al*. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* [Internet] 2001;**345**:1388-1393. *New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*. doi:10.1056/NEJM0a003005.

## H

---

Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* [Internet] 2009;**460**:473-478. *Nature*. doi:10.1038/nature08162.

Heijden GW van der, Derijck AAHA, Ramos L, Giele M, Vlag J van der, Boer P de. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol* [Internet] 2006;**298**:458-469. Academic Press Inc. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.051.

- Heijden GW van der, Ramos L, Baart EB, Berg IM van den, Derijck AAHA, Vlag J van der, Martini E, Boer P de. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* [Internet] 2008;**8**:34. *BMC Dev Biol*. doi:10.1186/1471-213X-8-34.
- Heikema AP, Horst-Kreft D, Boers SA, Jansen R, Hiltmann SD, Koning W de, Kraaij R, Ridder MAJJ de, Houten CB van, Bont LJ, *et al*. Comparison of Illumina versus Nanopore 16S rRNA Gene Sequencing of the Human Nasal Microbiota. *Genes (Basel)* [Internet] 2020;**11**:1-17. *Genes (Basel)*. doi:10.3390/genes11091105.
- Henkel R, Maass G, Jung A, Haidl G, Schill W-B, Schuppe H-C. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* [Internet] 2007;**9**:299-304. *Asian J Androl*. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00270.x.
- Henkel R, Offor U, Fisher D. The role of infections and leukocytes in male infertility. *Andrologia* [Internet] 2021;**53**:e13743. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.13743.
- Homa ST, Vassiliou AM, Stone J, Killeen AP, Dawkins A, Xie J, Gould F, Ramsay JWA. A comparison between two assays for measuring seminal oxidative stress and their relationship with sperm DNA fragmentation and semen parameters. *Genes (Basel)* 2019;**10**:. MDPI AG. doi:10.3390/genes10030236.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, Abdo Z, Forney LJ, Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* [Internet] 2013;**100**:1261. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
- Houston BJ, Nixon B, King B V., Aitken RJ, Iulii GN De. Probing the Origins of 1,800 MHz Radio Frequency Electromagnetic Radiation Induced Damage in Mouse Immortalized Germ Cells and Spermatozoa in vitro. *Front Public Heal* [Internet] 2018;**6**:270. Frontiers Media SA. doi:10.3389/fpubh.2018.00270.

- Houston BJ, Nixon B, King B V., Iuliis GN De, Aitken RJ. The effects of radiofrequency electromagnetic radiation on sperm function. *Reproduction* [Internet] 2016;**152**:R263-R276. BioScientifica Ltd. doi:10.1530/REP-16-0126.
- Houston BJ, Nixon B, McEwan KE, Martin JH, King B V., Aitken RJ, Iuliis GN De. Whole-body exposures to radiofrequency-electromagnetic energy can cause DNA damage in mouse spermatozoa via an oxidative mechanism. *Sci Rep* [Internet] 2019;**9**:. Nature Research. doi:10.1038/s41598-019-53983-9.
- Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update* [Internet] 2001;**7**:363-369. Hum Reprod Update. doi:10.1093/humupd/7.4.363.
- Hoyes KP, Lord BI, McCann C, Hendry JH, Morris ID. Transgenerational effects of preconception paternal contamination with <sup>55</sup>Fe. *Radiat Res* [Internet] 2001;**156**:488-494. Radiation Research Society. doi:10.1667/0033-7587(2001)156[0488:TEOPPC]2.0.CO;2.
- Hud N V., Downing KH, Balhorn R. A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 1995;**92**:3581-3585. National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.92.8.3581.
- Hud N V., Vilfan ID. Toroidal DNA Condensates: Unraveling the Fine Structure and the Role of Nucleation in Determining Size. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet] 2005;**34**:295-318. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev.biophys.34.040204.144500.
- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the Elemental Packing Unit of DNA in Mammalian Sperm Cells by Atomic Force Microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 1993;**193**:1347-1354. Academic Press. doi:10.1006/bbrc.1993.1773.

Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, 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* [Internet] 1996;2:613-619. Oxford University Press. doi:10.1093/molehr/2.8.613.

Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature* [Internet] 2012a;486:215-221. Nature. doi:10.1038/nature1209.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* [Internet] 2012b;486:207-214. Nature. doi:10.1038/nature1234.

## I

---

Imhoff JF. Rhodopseudomonas. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;, p. 1-13. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbmo0806>. doi:10.1002/9781118960608.gbmo0806.

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* [Internet] 2015;21:411-426. Oxford University Press. doi:10.1093/humupd/dmv016.

Iuliis GN De, Newey RJ, King B V., Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One* [Internet] 2009a;4:. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0006446.

Iuliis GN De, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. *Biol Reprod* 2009b;81:517-524. Oxford University Press (OUP). doi:10.1095/biolreprod.109.076836.

Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *Int J Androl* [Internet] 2009;**32**:462-467. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00878.x.

## J

---

Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertil Steril* [Internet] 1996;**66**:463-467. Elsevier Inc. doi:10.1016/S0015-0282(16)58520-3.

Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: A comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med* [Internet] 2019;**46**:14-21. doi:10.5653/cerm.2019.46.1.14.

Jenkins S V, Vang KB, Gies A, Griffin RJ, Jun S-R, Nookaew I, Dings RPM. Sample storage conditions induce post-collection biases in microbiome profiles. *BMC Microbiol* [Internet] 2018;**18**:227. BMC Microbiol. doi:10.1186/s12866-018-1359-5.

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *Eur Urol* [Internet] 2012;**62**:324-332. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.eururo.2012.04.048.

## K

---

Kang C, Punjani N, Lee RK, Li PS, Goldstein M. Effect of varicoceles on spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* [Internet] 2021; Elsevier Ltd Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33965333/>. doi:10.1016/j.semcdb.2021.04.005.

Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 1996;**93**:13770. National Academy of Sciences. doi:10.1073/PNAS.93.24.13770.

- Kaur K, Prabha V. Spermagglutinating *Escherichia coli* and its role in infertility: In vivo study. *Microb Pathog* [Internet] 2014;**69-70**:33-38. Academic Press. doi:10.1016/j.micpath.2014.03.010.
- Kawasaki T, Kuzuyama T, Furihata K, Itoh N, Seto H, Dairi T. A relationship between the mevalonate pathway and isoprenoid production in actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet] 2003;**56**:957-966. *J Antibiot (Tokyo)*. doi:10.7164/antibiotics.56.957.
- Kermes K, Punab M, Lõivukene K, Mändar R. Anaerobic seminal fluid microflora in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients. *Anaerobe* [Internet] 2003;**9**:117-123. Academic Press. doi:10.1016/S1075-9964(03)00085-4.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell WMC. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2013;**138**:261-267. *Anim Reprod Sci*. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.02.005.
- Kiessling AA, Desmarais BM, Yin H-Z, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril* [Internet] 2008;**90**:1744-1756. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.08.083.
- Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* [Internet] 2016;**26**:1721-1729. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/gr.210641.116.
- Kitaya K, Nagai Y, Arai W, Sakuraba Y, Ishikawa T. Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure. *Mediators Inflamm* [Internet] 2019;**2019**:1-10. Hindawi Limited. doi:10.1155/2019/4893437.
- Kiwitt-Cárdenas J, Adoamnei E, Arense-Gonzalo JJ, Sarabia-Cos L, Vela-Soria F, Fernández MF, Gosálvez J, Mendiola J, Torres-Cantero AM. Associations between urinary concentrations of bisphenol A and sperm DNA fragmentation in young men. *Environ Res* [Internet] 2021;**199**:111289. *Environ Res*. doi:10.1016/j.envres.2021.111289.

- Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciolk T, McCall L-I, McDonald D, *et al.* Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol* [Internet] 2018;**16**:410-422. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41579-018-0029-9.
- Koedooder R, Mackens S, Budding A, Fares D, Blockeel C, Laven J, Schoenmakers S. Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update* [Internet] 2019;**25**:298-325. Oxford University Press. doi:10.1093/humupd/dmy048.
- Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol* [Internet] 2019;**17**:742-753. Nat Rev Microbiol. doi:10.1038/s41579-019-0256-8.
- Koppers AJ, Iuliis GN De, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2008;**93**:3199-3207. doi:10.1210/jc.2007-2616.
- Kopylova E, Navas-Molina JA, Mercier C, Xu ZZ, Mahé F, He Y, Zhou H-W, Rognes T, Caporaso JG, Knight R. Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art. *mSystems* [Internet] 2016;**1**. American Society for Microbiology (ASM). doi:10.1128/MSYSTEMS.00003-15.
- Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear Matrix Interactions within the Sperm Genome. *J Biol Chem* [Internet] 1996;**271**:11619-11622. J Biol Chem. doi:10.1074/jbc.271.20.11619.
- Kretser D de. Male infertility. *Lancet* [Internet] 1997;**349**:787-790. Lancet Publishing Group. doi:10.1016/S0140-6736(96)08341-9.
- Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* [Internet] 2011;**13**:47. NIH Public Access. doi:10.1038/NRG3129.

- Kumar D, Upadhy D, Uppangala S, Salian SR, Kalthur G, Adiga SK. Nuclear DNA fragmentation negatively affects zona binding competence of y bearing mouse spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2013;**30**:1611-1615. *J Assist Reprod Genet*. doi:10.1007/s10815-013-0123-x.
- Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL, Rabbolini DJ, Othman M. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost* [Internet] 2019;**45**:661-673. doi:10.1055/s-0039-1688446.
- Kumar N, Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015;**8**:191-196. Medknow Publications. doi:10.4103/0974-1208.170370.
- Kurata S, Hiradate Y, Umezu K, Hara K, Tanemura K. Capacitation of mouse sperm is modulated by gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration. *J Reprod Dev* [Internet] 2019;**65**:327-334. *J Reprod Dev*. doi:10.1262/jrd.2019-008.

## L

---

- Lamirande E de, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 1993;**14**:157-166. *Free Radic Biol Med*. doi:10.1016/0891-5840(93)90006-G.
- LeBlanc JG, Laiño JE, Valle MJ del, Vannini V, Sinderen D van, Taranto MP, Valdez GF de, Giori GS de, Sesma F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* [Internet] 2011;**111**:1297-1309. *J Appl Microbiol*. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x.
- Leveling T. The relationship between pH and Conductivity in a Lithium Contaminated , De-ionized Water System. 2002;**1**-11.
- Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* [Internet] 2007;**134**:31-40. doi:10.1530/REP-07-0152.



- Lewis SEM, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum Fertil* [Internet] 2010;**13**:201-207. doi:10.3109/14647273.2010.528823.
- Li Y, Tong Z, Ling J. Effect of the three *Enterococcus faecalis* strains on apoptosis in MC3T3 cells. *Oral Dis* [Internet] 2019;**25**:309-318. Oral Dis. doi:10.1111/odi.12883.
- Lin MC, Tsai TC, Yang YS. Measurement of viscosity of human semen with a rotational viscometer. *J Formos Med Assoc* [Internet] 1992;**91**:419-423. J Formos Med Assoc.
- Liu H, Zhang C, Zhang X, Tan K, Zhang H, Cheng D, Ye T, Li S, Ma H, Zheng H. A novel carotenoids-producing marine bacterium from noble scallop *Chlamys nobilis* and antioxidant activities of its carotenoid compositions. *Food Chem* [Internet] 2020;**320**:126629. Food Chem. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126629.
- Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet] 2016;**14**:265-279. Genomics Proteomics Bioinformatics. doi:10.1016/j.gpb.2016.05.004.
- Lüke L, Vicens A, Tourmente M, Roldan ERS. Evolution of protamine genes and changes in sperm head phenotype in rodents. *Biol Reprod* [Internet] 2014;**90**:67. Biol Reprod. doi:10.1095/biolreprod.113.115956.
- Lundy SD, Sangwan N, Parekh N V., Selvam MKP, Gupta S, McCaffrey P, Bessoif K, Vala A, Agarwal A, Sabanegh ES, *et al.* Functional and Taxonomic Dysbiosis of the Gut, Urine, and Semen Microbiomes in Male Infertility. *Eur Urol* [Internet] 2021; Elsevier B.V. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283821000191>. doi:10.1016/j.eururo.2021.01.014.
- Lundy SD, Vij SC, Rezk AH, Cohen JA, Bajic P, Ramasamy R. The microbiome of the infertile male. *Curr Opin Urol* [Internet] 2020;**30**:355-362. Curr Opin Urol. doi:10.1097/MOU.0000000000000742.

## M

---

- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Brock. Biologia de los Microorganismos*. 2015; Pearson: Madrid.
- Maestri S. Development of novel bioinformatic pipelines for MinION-based DNA barcoding. 2021; University of Verona: Verona Available from: <https://iris.univr.it/retrieve/handle/11562/1042782/205364/>.
- Maestri S, Cosentino E, Paterno M, Freitag H, Garces JM, Marcolungo L, Alfano M, Njunjić I, Schilthuizen M, Slik F, *et al*. A Rapid and Accurate MinION-Based Workflow for Tracking Species Biodiversity in the Field. *Genes* 2019, Vol 10, Page 468 [Internet] 2019;10:468. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi:10.3390/GENES10060468.
- Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* [Internet] 1997;16:1087-1097. Mary Ann Liebert Inc. doi:10.1089/dna.1997.16.1087.
- Majzoub A, Arafa M, Ansari W El, Mahdi M, Agarwal A, Al-Said S, Elbardisi H. Correlation of oxidation reduction potential and total motile sperm count: Its utility in the evaluation of male fertility potential. *Asian J Androl* 2020;22:317-322. Wolters Kluwer Medknow Publications. doi:10.4103/aja.aja\_75\_19.
- Majzoub A, Arafa M, Mahdi M, Agarwal A, Said S Al, Al-Emadi I, Ansari W El, Alattar A, Rumaihi K Al, Elbardisi H. Oxidation–reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J Urol* [Internet] 2018;16:87-95. Arab Association of Urology. doi:10.1016/j.aju.2017.11.014.
- Malić Vončina S, Golob B, Ihan A, Kopitar AN, Kolbezen M, Zorn B. Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined

- are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertil Steril* [Internet] 2016;**105**:637-644.e1. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.037.
- Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res* [Internet] 2013;**69**:32-41. Pharmacol Res. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.019.
- Mändar R, Punab M, Borovkova N, Lapp E, Kiiker R, Korrovits P, Metspalu A, Krjutškov K, Nlvak H, Preem JK, *et al.* Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Res Microbiol* 2015;**166**:440-447. Elsevier Masson. doi:10.1016/J.RESMIC.2015.03.009.
- Mändar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, Preem JK, Oopkaup K, Salumets A, Truu J. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol* [Internet] 2017;**24**:211-216. Blackwell Publishing. doi:10.1111/iju.13286.
- Marchandin H, Juvonen R, Haikara A. Megasphaera. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;, p. 1-16. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00697>. doi:10.1002/9781118960608.gbm00697.
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* [Internet] 2015;**3**:31. Springer Nature. doi:10.1186/s40168-015-0094-5.
- Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients* [Internet] 2020;**12**:. MDPI AG. doi:10.3390/nu12041107.
- Marques FZ, Mackay CR, Kaye DM. Beyond gut feelings: how the gut microbiota regulates blood pressure. *Nat Rev Cardiol* [Internet] 2018;**15**:20-32. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrcardio.2017.120.

- Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P. *Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. Folia Biol* 2012;**58**:
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* [Internet] 2012;**9**:e1001356. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pmed.1001356.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 2012 *63* [Internet] 2011;**6**:610-618. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ismej.2011.139.
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, Méo MP De, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet] 1993;**288**:47-63. *Mutat Res*. doi:10.1016/0027-5107(93)90207-V.
- Mending W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol* [Internet] 2016;**902**:, p. 83-93. Springer New York LLC. doi:10.1007/978-3-319-31248-4\_6.
- Meyer OO. Oligotropha. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;; p. 1-7. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbmo0804>. doi:10.1002/9781118960608.gbmo0804.
- Migliore L, Naccarati A, Zanello A, Scarpato R, Bramanti L, Mariani M. Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum Reprod* [Internet] 2002;**17**:2912-2918. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/17.11.2912.
- Miller CS, Baker BJ, Thomas BC, Singer SW, Banfield JF. EMIRGE: reconstruction of full-length ribosomal genes from microbial community short read sequencing data. *Genome Biol* 2011 *125* [Internet] 2011;**12**:1-14. BioMed Central. doi:10.1186/GB-2011-12-5-R44.

- Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield JF. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS One* [Internet] 2013;**8**:e56018. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0056018.
- Mitchell LA, Iuliis GN De, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: Development of an improved methodology. *Int J Androl* [Internet] 2011;**34**:2-13. *Int J Androl*. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x.
- Mizera A, Kuczaj M, Szul A, Jędraszczyk J. Effect of addition of busserelin acetate to the extender on motility and viability of bovine spermatozoa. *Anim Biotechnol* [Internet] 2019;**30**:99-104. *Anim Biotechnol*. doi:10.1080/10495398.2018.1521821.
- Mo H, Elson CE. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. *J Nutr* [Internet] 1999;**129**:804-813. *J Nutr*. doi:10.1093/jn/129.4.804.
- Monteiro C, Marques PI, Cavadas B, Damião I, Almeida V, Barros N, Barros A, Carvalho F, Gomes S, Seixas S. Characterization of microbiota in male infertility cases uncovers differences in seminal hyperviscosity and oligoasthenoteratozoospermia possibly correlated with increased prevalence of infectious bacteria. *Am J Reprod Immunol* [Internet] 2018;**79**:e12838. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/aji.12838.
- Moreno I, Simon C. Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reprod Med Biol* [Internet] 2019;**18**:40-50. John Wiley and Sons Ltd. doi:10.1002/rmb2.12249.
- Morse SA, Hebel BH. Effect of pH on the growth and glucose metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* [Internet] 1978;**21**:87-95. American Society for Microbiology (ASM). doi:10.1128/iai.21.1.87-95.1978.

- Mudrak O. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* [Internet] 2005;**118**:4541-4550. *J Cell Sci*. doi:10.1242/jcs.02581.
- Mudrak O, Chandra R, Jones E, Godfrey E, Zalensky A. Reorganisation of human sperm nuclear architecture during formation of pronuclei in a model system. *Reprod Fertil Dev* [Internet] 2009;**21**:665. *Reprod Fertil Dev*. doi:10.1071/RD08269.
- Munckhof EHA van den, Hafkamp HC, Kluijver J de, Kuijper EJ, Koning MNC de, Quint WG V., Knetsch CW. Nasal microbiota dominated by *Moraxella* spp. is associated with respiratory health in the elderly population: a case control study. *Respir Res* [Internet] 2020;**21**:181. BioMed Central. doi:10.1186/s12931-020-01443-8.
- Muñoz V, Ibáñez F, Tordable M, Megías M, Fabra A. Role of reactive oxygen species generation and Nod factors during the early symbiotic interaction between bradyrhizobia and peanut, a legume infected by crack entry. *J Appl Microbiol* [Internet] 2015;**118**:182-192. *J Appl Microbiol*. doi:10.1111/jam.12669.
- Muratori M, Forti G, Baldi E. Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytom Part A* [Internet] 2008;**73**:785-787. *Cytometry A*. doi:10.1002/cyto.a.20615.

## N

---

- Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem* 1993;**39**:448-452. England.
- Naessens A, Foulon W, Debrucker P, Devroey P, Lauwers S. Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertil Steril* [Internet] 1986;**45**:101-105. Elsevier. doi:10.1016/S0015-0282(16)49105-3.

- National Center for Biotechnology Information. Genes database. 2021; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Nazmara Z, Shirinbayan P, reza Asgari H, Ahadi R, Asgari F, Maki CB, Fattahi F, Hosseini B, Janzamin E, Koruji M. The epigenetic alterations of human sperm cells caused by heroin use disorder. *Andrologia* [Internet] 2021;53:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.13799.
- Nel Van Zyl K, Whitelaw AC, Newton-Foot M. The effect of storage conditions on microbial communities in stool. *PLoS One* [Internet] 2020;15:e0227486. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0227486.
- Nili HA, Mozdarani H, Aleyasin A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2009;18:479-485. Reproductive Healthcare Ltd. doi:10.1016/S1472-6483(10)60123-x.
- Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, *et al.* Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep* [Internet] 2018;8:16173. Sci Rep. doi:10.1038/s41598-018-34571-9.
- Nogacka AM, Gómez-Martín M, Suárez A, González-Bernardo O, los Reyes-Gavilán CG de, González S. Xenobiotics Formed during Food Processing: Their Relation with the Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet] 2019;20:2051. MDPI AG. doi:10.3390/ijms20082051.
- Nordkap L, Priskorn L, Bräuner E V., Marie Hansen Å, Kirstine Bang A, Holmboe SA, Winge SB, Egeberg Palme DL, Mørup N, Erik Skakkebæk N, *et al.* Impact of psychological stress measured in three different scales on testis function: A cross-sectional study of 1362 young men. *Andrology* [Internet] 2020;8:1674-1686. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/andr.12835.

- Nosi E, Gritzapis AD, Makarounis K, Georgoulas G, Kapetanios V, Varla-Leftherioti M, Venieratos P, Papanikopoulos C, Konstantinidou A, Tsilivakos V. Improvement of Sperm Quality in Hyperviscous Semen following DNase i Treatment. *Int J Endocrinol* 2019;**2019**:. Hindawi Limited. doi:10.1155/2019/6325169.
- Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston S, Gosálvez J. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci [Internet]* 2012;**19**:1163-1168. *Reprod Sci*. doi:10.1177/1933719112459238.
- O**
- 
- Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update [Internet]* 1999;**5**:399-420. *Hum Reprod Update*. doi:10.1093/humupd/5.5.399.
- Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schüttau H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R. Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia [Internet]* 1994;**26**:289-293. *Andrologia*. doi:10.1111/j.1439-0272.1994.tb00804.x.
- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J-Z, Abe F, Osawa R. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol [Internet]* 2016;**16**:90. *BMC Microbiol*. doi:10.1186/s12866-016-0708-5.
- Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update [Internet]* 2008;**14**:605-621. Oxford Academic. doi:10.1093/humupd/dmno42.
- Ostermeier GC. Nuclear matrix association of the human  $\gamma$ -globin locus utilizing a novel approach to quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res [Internet]* 2003;**31**:3257-3266. *Nucleic Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkg424.



Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 1984;**123**:291-298. *Biochem Biophys Res Commun*. doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X.

Ouhadi V, Goodarzi A. Factors impacting the electro conductivity variations of clayey soils. *Iran J Sci Technol Trans B, Eng* 2007;**31**:109-121.

## P

---

Parata L, Nielsen S, Xing X, Thomas T, Egan S, Vergés A. Age, gut location and diet impact the gut microbiome of a tropical herbivorous surgeonfish. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet] 2020;**96**:. *FEMS Microbiol Ecol*. doi:10.1093/femsec/fiz179.

Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, *et al*. Scikit-learn: Machine Learning in Python Gaël Varoquaux Bertrand Thirion Vincent Dubourg Alexandre Passos PEDREGOSA, VAROQUAUX, GRAMFORT ET AL. Matthieu Perrot. *J Mach Learn Res* [Internet] 2011;**12**:2825-2830.

Peluso G, Palmieri A, Cozza PP, Morrone G, Verze P, Longo N, Mirone V. The study of spermatic DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. *Arch Ital di Urol e Androl* [Internet] 2013;**85**:8-13. *Arch Ital Urol Androl*. doi:10.4081/aiua.2013.1.8.

Pericard P, Dufresne Y, Couderc L, Blanquart S, Touzet H. MATAM: reconstruction of phylogenetic marker genes from short sequencing reads in metagenomes. *Bioinformatics* [Internet] 2018;**34**:585-591. Oxford Academic. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTX644.

Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, *et al*. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* [Internet] 2009;**19**:2317-2323. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/gr.096651.109.

- Plessis SS Du, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol* [Internet] 2010;7:153-161. *Nat Rev Urol*. doi:10.1038/nrurol.2010.6.
- Plessis SS Du, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)* [Internet] 2013;5:224-231. *Front Biosci (Elite Ed)*. doi:10.2741/e610.
- Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M. The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus «Best Practice» for 16S Microbiome Studies. *Appl Environ Microbiol* [Internet] 2018;84. American Society for Microbiology (ASM). doi:10.1128/AEM.02627-17.
- Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S, Poongothai S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 2009;50:336-347.
- Priest FG. Paenibacillus. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015; p. 1-40. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00553>. doi:10.1002/9781118960608.gbm00553.

## Q

---

- QIIME 2 forum. Import both forward and reverse reads or only forward reads? - User Support - QIIME 2 Forum. 2017; Available from: <https://forum.qiime2.org/t/import-both-forward-and-reverse-reads-or-only-forward-reads/1107>.
- QIIME 2 forum. Technical support re: Illumina want to use only forward reads - User Support - QIIME 2 Forum. 2019; Available from: <https://forum.qiime2.org/t/technical-support-re-illumina-want-to-use-only-forward-reads/9061>.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* [Internet] 2013;41:D590-D596. Oxford Academic. doi:10.1093/NAR/GKS1219.

## R

---

- Rana M, Agarwal A. Seminal Oxidation-Reduction Potential. In Parekattil, Sijo J.; Esteves, Sandro C.; Agarwal A, editor. *Male Infertil* 2020; p. 377-387. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-32300-4\_30.
- Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2016;**469**:967. NIH Public Access. doi:10.1016/J.BBRC.2015.12.083.
- Rateb SA. Purification of cryopreserved camel spermatozoa following protease-based semen liquefaction by lectin-functionalized DNA-defrag magnetic nanoparticles. *Reprod Domest Anim* [Internet] 2021;**56**:183-192. Reprod Domest Anim. doi:10.1111/rda.13863.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, *et al*. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 2011;**108** Suppl:4680-4687. Proc Natl Acad Sci U S A. doi:10.1073/pnas.100261107.
- Rea D, Coppola G, Palma G, Barbieri A, Luciano A, Prete P Del, Rossetti S, Berretta M, Facchini G, Perdonà S, *et al*. Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. *Oncotarget* [Internet] 2018;**9**:17915-17927. Impact Journals LLC. doi:10.18632/oncotarget.24681.
- Redondo-Useros N, Nova E, González-Zancada N, Díaz LE, Gómez-Martínez S, Marcos A. Microbiota and Lifestyle: A Special Focus on Diet. *Nutrients* [Internet] 2020;**12**:1-54. Nutrients. doi:10.3390/nu12061776.
- Rehewy MSE, Hafez ESE, Thomas A, Brown WJ. Aerobic and Anaerobic Bacterial Flora in Semen from Fertile and Infertile Groups of Men. *Arch Androl* [Internet] 1979;**2**:263-268. Informa Healthcare. doi:10.3109/01485017908987323.

- Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* [Internet] 2001;**73**:437s-443s. American Society for Nutrition. doi:10.1093/ajcn/73.2.437s.
- Ribas-Maynou J, Abad C, García-Segura S, Oliver-Bonet M, Prada E, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Sperm chromatin condensation and single- and double-stranded DNA damage as important parameters to define male factor related recurrent miscarriage. *Mol Reprod Dev* [Internet] 2020;**87**:1126-1132. John Wiley and Sons Inc. doi:10.1002/mrd.23424.
- Ribas-Maynou J, Benet J. Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes (Basel)* [Internet] 2019;**10**:105. MDPI AG. doi:10.3390/genes10020105.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* [Internet] 2012a;**27**:652-658. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/der461.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013;**1**:715-722. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortés P, Navarro J, Benet J. Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. In Schlatt S, editor. *PLoS One* [Internet] 2012b;**7**:e44679. PLoS One. doi:10.1371/journal.pone.0044679.
- Rijnders S, Bolscher JGM, McDonnell J, Vermeiden JPW. Filling Time of a Lamellar Capillary-Filling Semen Analysis Chamber Is a Rapid, Precise, and Accurate Method to Assess Viscosity of Seminal Plasma. *J Androl* [Internet] 2007;**28**:461-465. doi:10.2164/jandrol.106.002360.

- Robeson MS, O'Rourke DR, Kaehler BD, Ziemski M, Dillon MR, Foster JT, Bokulich NA. RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses. *bioRxiv* [Internet] 2020;2020.10.05.326504. Cold Spring Harbor Laboratory Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.05.326504v1>. doi:10.1101/2020.10.05.326504.
- Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* [Internet] 2012;27:2908-2917. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/des261.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* [Internet] 2016;4:e2584. PeerJ Inc. doi:10.7717/PEERJ.2584.
- Roychoudhury S, Sharma R, Sikka S, Agarwal A. Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2016;33:627-635. Springer New York LLC. doi:10.1007/s10815-016-0677-5.

## S

---

- Sakkas D, Mariethoz E, John JC St. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* [Internet] 1999a;251:350-355. Academic Press Inc. doi:10.1006/excr.1999.4586.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* [Internet] 1999b;4:31-37. Rev Reprod. doi:10.1530/ror.o.0040031.
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertil Steril* [Internet] 2002;78:313-318. Fertil Steril. doi:10.1016/S0015-0282(02)03219-3.

- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* [Internet] 2014;**12**:87. BMC Biol. doi:10.1186/s12915-014-0087-z.
- Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, Recio R, Morán-Martínez J, Cebrián ME, Quintanilla-Vega B. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet] 2004;**196**:108-113. Toxicol Appl Pharmacol. doi:10.1016/j.taap.2003.11.023.
- Sawyer DE, Roman SD, Aitken RJ. Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. *Redox Rep* [Internet] 2001;**6**:182-184. Taylor & Francis. doi:10.1179/135100001101536157.
- Schmidt TSB, Rodrigues JFM, Mering C von. Limits to robustness and reproducibility in the demarcation of operational taxonomic units. *Environ Microbiol* [Internet] 2015;**17**:1689-1706. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1111/1462-2920.12610.
- Selway CA, Eisenhofer R, Weyrich LS. Microbiome applications for pathology: challenges of low microbial biomass samples during diagnostic testing. *J Pathol Clin Res* [Internet] 2020;**6**:97. Wiley-Blackwell. doi:10.1002/CJP2.151.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* [Internet] 2016;**14**:e1002533. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Sepidarkish M, Maleki-Hajiagha A, Maroufizadeh S, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Razavi M. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes* [Internet] 2020;**44**:549-558. Springer Nature. doi:10.1038/s41366-020-0524-8.

- Shackelford CD, Malusis MA, Majeski MJ, Stern RT. Electrical conductivity breakthrough curves. *J Geotech Geoenvironmental Eng* [Internet] 1999;**125**:260-270. ASCE. doi:10.1061/(ASCE)1090-0241(1999)125:4(260).
- Shaman JA, Yamauchi Y, Steven Ward W. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem* [Internet] 2007;**102**:680-688. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/jcb.21321.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia* [Internet] 2021;**53**:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.13738.
- Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010;**76**:1380-1386. *Urology*. doi:10.1016/j.urology.2010.04.036.
- Shekarriz M, Thomas AJ, Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology* [Internet] 1995;**45**:103-107. *Urology*. doi:10.1016/S0090-4295(95)97088-6.
- Siebert A, Hofmann K, Staib L, Doll E V, Scherer S, Wenning M. Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: impact of DNA extraction and library-PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet] 2021;**105**:4761-4773. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s00253-021-11353-4.
- Simas JN, Mendes TB, Fischer LW, Vendramini V, Miraglia SM. Resveratrol improves sperm DNA quality and reproductive capacity in type 1 diabetes. *Andrology* [Internet] 2021;**9**:384-399. *Andrology*. doi:10.1111/andr.12891.
- Simon L, Aston KI, Emery BR, Hotaling J, Carrell DT. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. *Andrologia* [Internet] 2017;**49**:. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/and.12608.

- Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2011a;**23**:724-734. Reprod Biomed Online. doi:10.1016/j.rbmo.2011.08.010.
- Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, Emery B, Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* [Internet] 2014;**29**:904-917. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/deu040.
- Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SEMM. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* [Internet] 2011b;**95**:652-657. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.08.019.
- 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* [Internet] 1988;**175**:184-191. Exp Cell Res. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Skafté-Holm A, Humaidan P, Bernabeu A, Lledo B, Jensen JS, Haahr T. The Association between Vaginal Dysbiosis and Reproductive Outcomes in Sub-Fertile Women Undergoing IVF-Treatment: A Systematic PRISMA Review and Meta-Analysis. *Pathogens* [Internet] 2021;**10**:295. MDPI AG. doi:10.3390/pathogens10030295.
- Sociedad Española de Fertilidad. *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Es.* In Matorras R, Hernández J, editors. 2007; Adalia: Madrid.
- Sociedad Española de Fertilidad. *Registro Nacional de Actividad 2018-Registro SEF* [Internet]. 2018; Available from: <https://www.registrosef.com/index.aspx?ReturnUrl=%2F#Anteriores>.



- Solov'eva L, Svetlova M, Bodinski D, Zalensky AO. Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. *Chromosom Res* [Internet] 2004;**12**:817-823. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10577-005-5513-1.
- Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E, Ward WS. An Endogenous Nuclease in Hamster, Mouse, and Human Spermatozoa Cleaves DNA into Loop-Sized Fragments. *J Androl* [Internet] 2005;**26**:272-280. American Society of Andrology Inc. doi:10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x.
- Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. *Biol Reprod* [Internet] 2003;**69**:2029-2035. Biol Reprod. doi:10.1095/biolreprod.103.020594.
- Sui H-Y, Weil AA, Nuwagira E, Qadri F, Ryan ET, Mezzari MP, Phipatanakul W, Lai PS. Impact of DNA Extraction Method on Variation in Human and Built Environment Microbial Community and Functional Profiles Assessed by Shotgun Metagenomics Sequencing. *Front Microbiol* [Internet] 2020;**11**:953. Front Microbiol. doi:10.3389/fmicb.2020.00953.
- Suresh A, Rajesh A, Bhat RM, Rai Y. Cytolytic vaginosis: A review. *Indian J Sex Transm Dis AIDS* [Internet] 2009;**30**:48-50. Wolters Kluwer -- Medknow Publications. doi:10.4103/0253-7184.55490.

## T

---

- Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology* [Internet] 2012;**80**:822-825. Urology. doi:10.1016/j.urology.2012.07.002.
- Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'argenio V. Microbiota and human reproduction: The case of male infertility. *High-Throughput* [Internet] 2020a;**9**:. MDPI AG. doi:10.3390/ht9020010.

Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility. *High-Throughput* [Internet] 2020b;**9**:12. MDPI AG. doi:10.3390/ht9020012.

Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballecà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* [Internet] 2006;**21**:2084-2089. Oxford University Press. doi:10.1093/humrep/del114.

Tvrđá E, Arroyo F, Gosálvez J. Dynamic assessment of human sperm DNA damage I: the effect of seminal plasma-sperm co-incubation after ejaculation. *Int Urol Nephrol* [Internet] 2018;**50**:1381-1388. Springer Netherlands. doi:10.1007/s11255-018-1915-9.

## U

---

UCSD School of Medicine. Medpics - UC San Diego, School of Medicine Available from:  
<https://medpics.ucsd.edu/index.cfm?curpage=image&course=hist&mode=browse&lesson=42&img=798>.

Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet] 2014;**106**:28.4.1-28.4.14. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/0471142727.MB2804S106.

Utsuno H, Miyamoto T, Oka K, Shiozawa T. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa. *Hum Reprod* [Internet] 2014;**29**:2374-2381. Hum Reprod. doi:10.1093/humrep/deu225.

## V

---

Valcarce DG, Genovés S, Riesco MF, Martorell P, Herráez MP, Ramón D, Robles V. Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors. *Benef Microbes* [Internet] 2017;**8**:193-206. Benef Microbes. doi:10.3920/BM2016.0122.

- Valcarce DG, Riesco MF, Martínez-Vázquez JM, Robles V. Long Exposure to a Diet Supplemented with Antioxidant and Anti-Inflammatory Probiotics Improves Sperm Quality and Progeny Survival in the Zebrafish Model. *Biomolecules* [Internet] 2019;**9**:. Biomolecules. doi:10.3390/biom9080338.
- Vallely LM, Egli-Gany Di, Pomat W, Homer CSE, Guy R, Wand H, Silver B, Rumbold AR, Kaldor JM, Low N, *et al.* Adverse pregnancy and neonatal outcomes associated with *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum*: A systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open* [Internet] 2018;**8**:. BMJ Publishing Group. doi:10.1136/bmjopen-2018-024175.
- Vancanneyt M, Segers P, Abraham W-R, Vos P De. Brevundimonas. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;:, p. 1-14. American Cancer Society Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00791>. doi:10.1002/9781118960608.gbm00791.
- Vereschako GG, Chueshova N V. Reaction of Reproductive System and Epididymal Spermatozoa .of Rats to Electromagnetic Radiation from Mobile Phone (1745 MHz) of Various Duration. *Radiatsionnaia Biol Radioecol* 2017;**57**:71-76. Russia (Federation).
- Vickram AS, Dhama K, Chakraborty S, Samad HA, Latheef SK, Sharun K, Khurana SK, K A, Tiwari R, Bhatt P, *et al.* Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision. *Vaccines* [Internet] 2019;**7**:. Vaccines (Basel). doi:10.3390/vaccines7030116.
- Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoruso DC, Ribecco MT, Romano A, Fogliano V, Caporaso N, D'Argenio G. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology* [Internet] 2010;**52**:1652-1661. Hepatology. doi:10.1002/HEP.23902.

## W

---

- Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol* [Internet] 2018;**16**:35-43. Arab Association of Urology. doi:10.1016/j.aju.2017.11.001.
- Wagner Mackenzie B, Waite DW, Taylor MW. Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front Microbiol* [Internet] 2015;**6**:130. Frontiers Media SA. doi:10.3389/fmicb.2015.00130.
- Wang Y, Liang CL, Wu JQ, Xu C, Qin SX, Gao ES. Do Ureaplasma urealyticum infections in the genital tract affect semen quality? *Asian J Androl* [Internet] 2006;**8**:562-568. Asian J Androl. doi:10.1111/j.1745-7262.2006.00190.x.
- Wang Y, Liu K, Han Q, Yang H, Zhou N, Sun L, Zou P, Ling X, Ao L, Cui Z, *et al.* An exposomic approach with 138 chemical and non-chemical exposures to predict 32 biomarkers of male reproductive damages: A case study of college students in Chongqing, China. *Sci Total Environ* 2021;**767**:144380. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144380.
- Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* [Internet] 1993;**48**:1193-1201. Biol Reprod. doi:10.1095/biolreprod48.6.1193.
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* [Internet] 2010;**16**:30-36. Mol Hum Reprod. doi:10.1093/molehr/gap080.
- Ward WS. Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *Am J Clin Exp Urol* [Internet] 2018;**6**:87-92. e-Century Publishing Corporation.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol Reprod* [Internet] 1991;**44**:569-574. Biol Reprod. doi:10.1095/biolreprod44.4.569.

- Ward WS, Kimura Y, Yanagimachi R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* [Internet] 1999;**60**:702-706. Society for the Study of Reproduction. doi:10.1095/biolreprod60.3.702.
- Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, Gajer P, Myers G, Timms P, Allan JA, *et al.* A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* [Internet] 2018;**58**:341-348. Blackwell Publishing. doi:10.1111/ajo.12754.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* [Internet] 1991;**173**:697-703. J Bacteriol. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang TTL, Yang TTL, Liu CY, Wu WY, Chang YA, *et al.* Bacterial communities in semen from men of infertile couples: Metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One* [Internet] 2014;**9**. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0110152.
- Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Licht TR. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome* [Internet] 2014;**2**:19. BioMed Central. doi:10.1186/2049-2618-2-19.
- Wilkins JR, Hundley VD. Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol* [Internet] 1990;**131**:995-1008. Oxford University Press. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a115620.
- Willems A, Gillis M. Comamonadaceae. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;; p. 1-6. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.fbmo0182>. doi:10.1002/9781118960608.fbmo0182.

- Willén M, Holst E, Myhre EB, Olsson AM. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand J Urol Nephrol* [Internet] 1996;**30**:387-393. Informa Healthcare. doi:10.3109/00365599609181315.
- Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* [Internet] 2019;**20**:257. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s13059-019-1891-0.
- Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* [Internet] 2014;**15**:R46. Genome Biology. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* [Internet]. 2010;**17**.. World Health Organization: Geneva, Switzerland: WHO.
- World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2021; World Health Organization Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO: Geneva, Switzerland: WHO.

## Y

---

- Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T. Ralstonia. *Bergey's Man Syst Archaea Bact* [Internet] 2015;; p. 1-21. American Cancer Society Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbmo0941>. doi:10.1002/9781118960608.gbmo0941.
- Yang H, Zhang J, Xue Z, Zhao C, Lei L, Wen Y, Dong Y, Yang J, Zhang L. Potential Pathogenic Bacteria in Seminal Microbiota of Patients with Different Types of Dysspermatism. *Sci Rep* [Internet] 2020;**10**.. Nature Research. doi:10.1038/s41598-020-63787-x.
- Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, Huang Z. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil Steril* [Internet] 2014;**101**.. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.09.001.

Yuan C, Lei J, Cole J, Sun Y. Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data. *Bioinformatics* [Internet] 2015;**31**:i35-43. Bioinformatics. doi:10.1093/bioinformatics/btv231.

## Z

---

Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin Structure of Telomere Domain in Human Sperm. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2000;**279**:213-218. Academic Press Inc. doi:10.1006/bbrc.2000.3917.

Zalensky A, Zalenskaya I. Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem Soc Trans* [Internet] 2007;**35**:609-611. Biochem Soc Trans. doi:10.1042/BST0350609.

Zeyad A, Hamad M, Amor H, Hammadeh ME. Relationships between bacteriospermia, DNA integrity, nuclear protamine alteration, sperm quality and ICSI outcome. *Reprod Biol* [Internet] 2018;**18**:115-121. Reprod Biol. doi:10.1016/j.repbio.2018.01.010.

Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect* [Internet] 2020;**81**:17-47. J Infect. doi:10.1016/j.jinf.2020.01.023.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* [Internet] 2008;**23**:2663-2668. doi:10.1093/humrep/den321.

Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* [Internet] 2000;**55**:922-926. Urology. doi:10.1016/s0090-4295(00)00453-2.

Zini A, Lamirande E de, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* [Internet] 1993;**16**:183-188. Int J Androl. doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01177.x.

Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec H. Psychological factors in male partners of infertile couples: Relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl* [Internet] 2008;**31**:557-564. *Int J Androl*. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00806.x.





**ANNEX 1. CONSENTIMENT INFORMAT**



### **Consentiment de participació en estudi sobre microbiota seminal**

Breu descripció del projecte:

Amb aquest estudi es vol conèixer la flora bacteriana present en el semen humà i la seva relació amb la fertilitat masculina. Inicialment es comprovaran quines espècies de bacteris hi ha al líquid seminal de manera normal i fisiològica i es compararan amb els bacteris de pacients amb problemes de fertilitat per tractar de descobrir si algun bacteri està implicat en aquests problemes reproductius. Seguidament s'estudiarà que fan aquests bacteris per a provocar aquests problemes de fertilitat amb la intenció de discutir possibles solucions i/o tractaments.

La participació en aquest estudi implicarà estar d'acord amb els següents punts:

- La mostra seminal recollida NO es farà servir per a una altra activitat que no sigui la recerca científica. Mai serà utilitzada amb fins reproductius.
- La informació personal facilitada serà únicament utilitzada amb fins estadístics per a la recerca científica. No es farà servir per a altres activitats i mai seran compartides amb tercers segons la llei orgànica 3/2018 LOPD.
- Caldrà seguir les instruccions facilitades pel personal del centre.
- Els resultats de la recerca seran publicats de manera oberta en revistes científiques internacionals i mai es revelarà informació personal dels individus participants.
- Els resultats personals de qualitat seminal seran comunicats de manera privada a través del e-mail personal facilitat al final de la recerca.
- La participació en l'estudi es totalment voluntària. En qualsevol moment es pot renunciar i es pot demanar la modificació o eliminació de les dades personals facilitades.

Jo ..... entenc tota la informació facilitada en aquest document i dono el meu consentiment a participar voluntàriament en aquest estudi científic.

Signatura del participant



**ANNEX 2. QÜESTIONARI DE HISTÒRIA CLÍNICA I  
HÀBITS DE CONSUM**



## Historia clínica del donant

### 1. DADES D'IDENTIFICACIÓ

Nom i cognoms		Edat	ID
Municipi de naixement	Municipi/s de residència en els últims 10 anys		
Correu electrònic de contacte	Abstinència sexual	Data de recollida de la mostra	
	___ dies	/ /	
Tens fills?	Any de naixement de l'últim fill/a		

### 2. ESTIL DE VIDA ACTUAL

#### Hàbits de consum

- Tabac:  No fumador  Fumador
- Alcohol:
  - o Cervesa o vi  No consum  Ocasionalment  Habitualment
  - o Licors  No consum  Ocasionalment  Habitualment
  - o Altres: \_\_\_\_\_  No consum  Ocasionalment  Habitualment
- Cafeïna:  0  1  2  3  >3 cafès al dia
- Teïna:  0  1  2  3  >3 tes al dia
- Altres Xantines (xocolata, refresc de cola, guaraná, mate, etc.): \_\_\_\_\_ al dia
- Drogues:  No consum  Si: \_\_\_\_\_

Segueix alguna dieta alimentària especial? Quina? \_\_\_\_\_

#### Exposicions ambientals

- Exposició a radiacions ionitzants: \_\_\_\_\_
- Exposició a químics nocius: \_\_\_\_\_

La informació recollida en aquest qüestionari només serà utilitzada amb fins de recerca científica, publicada sempre de manera anònima, i no serà cedida a tercers. Les dades personals seran utilitzades amb finalitats comunicatives amb el donant de la mostra.



Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica



### 3. ESTAT DE SALUT

#### Malalties prèvies o cròniques

- Infecció seminal     Criptorquídia     Orquitis     Varicocele
- Malaltia genètica: \_\_\_\_\_
- Malaltia de transmissió sexual: \_\_\_\_\_
- Síndrome (malaltia sistèmica): \_\_\_\_\_
- Altres: \_\_\_\_\_

#### Tractaments actuals (últims 2 mesos)

- Antibiòtics     Immunosupressors     Corticoides sistèmics
- Quimioteràpia     Altres: \_\_\_\_\_





La informació recollida en aquest qüestionari només serà utilitzada amb fins de recerca científica, publicada sempre de manera anònima, i no serà cedida a tercers. Les dades personals seran utilitzades amb finalitats comunicatives amb el donant de la mostra.

**ANNEX 3. ARTICLE PUBLICAT**



Article

# Relationship of Seminal Oxidation-Reduction Potential with Sperm DNA Integrity and pH in Idiopathic Infertile Patients

Sergio Garcia-Segura <sup>1,\*</sup>, Jordi Ribas-Maynou <sup>1</sup>, Sandra Lara-Cerrillo <sup>2</sup>, Agustín García-Peiró <sup>2</sup>, Ana Belén Castel <sup>3</sup>, Jordi Benet <sup>1,\*</sup> and Maria Oliver-Bonet <sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Unit of Cell Biology and Medical Genetics, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Av. Can Domenech s/n, Bellaterra, 08193 Catalunya, Spain; j.ribas87@gmail.com

<sup>2</sup> CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre, C. Vallcorba 1-3, Sant Quirze del Vallès, 08192 Catalunya, Spain; info@cimab.es (S.L.-C.); agusti.garcia@uab.cat (A.G.-P.)

<sup>3</sup> Instituto de Fertilidad, C. Calçat 6, 07011 Palma Mallorca, Spain; abcastel@yahoo.es

<sup>4</sup> Genosolut, Camí dels Reis 308, 07010 Palma Mallorca, Spain

\* Correspondence: sergio.garcia.segura@uab.cat (S.G.-S.); jordi.benet@uab.cat (J.B.); maria.oliver@uab.cat (M.O.-B.)

Received: 16 July 2020; Accepted: 28 August 2020; Published: 1 September 2020



**Abstract:** Seminal oxidative stress (OS) is one of the most promising factors to describe the causes of idiopathic male infertility. Redox balance is essential in several biological processes related to fertility, so alterations such as high reactive oxygen species (ROS) levels or low antioxidant agent levels can compromise it. MiOXSYS has been developed to evaluate the seminal static oxidation-reduction potential (sORP) and it has been proposed as an effective diagnostic biomarker. However, its relationship with parameters like sperm DNA fragmentation (SDF), chromatin compaction status or seminal pH requires further analysis, making it the object of this study. Semen and sORP analysis were performed for all samples. A terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay (TUNEL) and Comet assay were used to assess SDF and chromomycin a3 (CMA3) test to assess sperm chromatin compaction. Regarding sORP measures, it was found that alkaline pH has an effect on sample reproducibility. To our knowledge, this unexpected effect has not been previously described. A statistical analysis showed that sORP correlated negatively with CMA3 positive cells and sperm motility, but not with SDF. As redox dysregulation, which occurs mainly at the testicular and epididymal level, causes chromatin compaction problems and leaves DNA exposed to damage, an excess of ROS could be counterbalanced further by a seminal supply of antioxidant molecules, explaining the negative correlation with CMA3 positive cells but no correlation with SDF. Our results show that the study of idiopathic infertility would benefit from a combined approach comprising OS analysis, SDF and chromatin compaction analysis.

**Keywords:** sperm; oxidative stress; oxidation-reduction potential; sperm DNA fragmentation; DNA damage; comet assay; DNA compaction; chromomycin A3; pH; male infertility

## 1. Introduction

Male infertility is a multifactorial disorder that is present in approximately half of the population of infertile couples [1–4]. Several authors have pointed out that a standard semen analysis, including sperm motility, concentration, morphology and physiological semen parameters, has limited diagnostic value [5–7]. Indeed, about 15% of infertile men present normozoospermia and idiopathic causes, and so require an in-depth study to find a more accurate diagnosis [2,8]. Together, these facts highlight

the need to improve male infertility diagnoses by adding relevant biomarkers, which will bring to light new biological mechanisms that allow a better understanding of infertility etiology.

A correct redox balance is essential for activating processes such as sperm capacitation, sperm hyperactivation, acrosomal reaction or oocyte fusion [9–13]. Over recent decades, a number of studies have shown that redox deregulation, either by an increase in reactive oxygen species (ROS) or a decrease in antioxidant activity, results in alterations in sperm motility, lipid peroxidation or sperm DNA fragmentation (SDF) [13–16]. Additionally, several works have described that infertile men have higher concentrations of ROS and lower levels of antioxidants [17–20]. Oxidative stress (OS) assessments are usually based on ROS level measurements in seminal plasma, but antioxidant levels, which can offset or exacerbate this cellular stress, are not usually calculated. A new methodology based on an electrochemical analysis of the oxidation-reduction potential (ORP), the MiOXSYS system, has recently been developed [21]. This system analyzes the seminal redox balance and has been proposed as an effective tool for the diagnosis of male infertility [22]. However, it is described that devices' measurements may be affected by seminal viscosity [23,24], but it is unknown whether it may be affected by other characteristics of seminal plasma.

Sperm DNA fragmentation (SDF) has also been established in recent decades as a biomarker for male infertility diagnoses. Different studies have shown that SDF values are inversely related to sperm motility and other reproductive health indicators, such as fertilization rates, implantation rates, or recurrent miscarriages [25–31], especially for *in vitro* fertilization. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and Comet assays display a very accurate sensitivity and specificity for predicting fertility rates [32,33]. The TUNEL assay is based on the detection of fluorescent labeling of the 3' free ends resulting from DNA breaks. The Comet assay is based on the release of nuclear protamines from the sperm chromatin and subsequent single-cell electrophoresis that allows the migration of DNA fragments to the positive pole, generating a comet-like tail. Additionally, the Comet assay is the only method that allows the quantitative measurement of DNA damage individually for each cell and the only one that detects the incidence of single-strand and double-strand breaks separately, depending on alkaline or neutral pH conditions, respectively [29]. Previous studies have demonstrated a direct correlation between seminal ROS and single-strand SDF [10,33,34].

Sperm chromatin condensation is also a parameter that has been effective in explaining male infertility. Several studies show that deficiencies in protamination have been associated with sperm head morphological defects, SDF, chromosome reorganization and varicocele patients [35–39]. The relationship between chromatin condensation, oxidative stress and DNA damage has been extensively studied [35,40,41]. As a result, comprehensive models like the double-step hypothesis suggested by Aitken and de Iulii have been proposed, stating that defects in chromatin remodeling can leave exposed areas that can subsequently be damaged by oxygen radicals, thus increasing the total amount of sperm DNA fragmentation [42].

The aim of the present study is to evaluate the relevance of ORP in idiopathic male infertility. To do so, the relationship between ORP and sperm DNA integrity biomarkers, such as DNA damage and chromatin condensation, has been analyzed. Additionally, the possible influence of seminal parameters, such as pH, on static oxidation-reduction potential (sORP) measurement has been evaluated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection

Seminal samples were obtained from male idiopathic patients from Instituto de Fertilidad of Palma de Mallorca, in collaboration with Genosalut and Universitat Autònoma de Barcelona. A total of 42 samples were collected, with 2–5 days of sexual abstinence. Samples were frozen immediately after liquefaction and transported to the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), where they were stored in liquid nitrogen at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  until its analysis. Prior to cryopreservation, a basic semen analysis (sperm concentration, motility, morphology and pH) was performed with the Sperm Class Analyzer

(SCA, Microptic, Barcelona, Spain), Sperm Blue (Microptic) and pH-indicator strips, according to the 2010 WHO guidelines [43]. Seminal viscosity was measured using 20 micron Leja chambers as previously suggested Rijnders [44], showing the results in centipoise (cps). All donors signed their informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of Corporació Sanitaria Parc Taulí (Ref.: 2014676).

## 2.2. Measurement of Oxidation Reduction Potential

The ORP was measured using the MiOXSYS system (Aytu BioScience, Englewood, CO, USA). As instructed in the manufacturer's protocol, 30  $\mu$ L of each sample were placed in the sensor [21,23]. Samples were analyzed twice consecutively in the same conditions. The electronic device reads the electron flux voltage from seminal redox reactions with a galvanostatic-based sensor and the displayed result is the static ORP (sORP) in millivolts (mV). The average of the two values obtained was subsequently normalized by the sperm concentration (nsORP-C) ( $\text{mV}/10^6$  sperm/mL), seminal viscosity (nsORP-V) ( $\text{mV}/\text{cps}$ ) and pH (nsORP-P) ( $\text{mV}/\text{U}$  pH). The cut-off value was set at  $1.34 \text{ mV}/10^6$  sperm/mL to discern between good quality seminal samples ( $\leq 1.34 \text{ mV}/10^6$  sperm/mL) from altered seminal samples ( $> 1.34 \text{ mV}/10^6$  sperm/mL), as has been established before [45]. Five samples were excluded after the device failed to measure their sORP, due to their high viscosity.

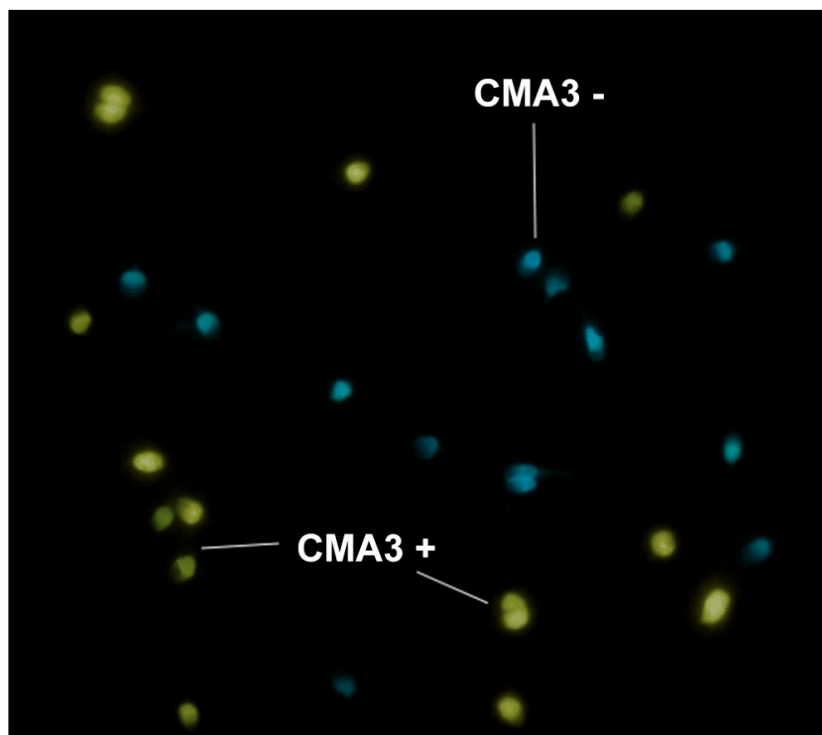
## 2.3. Sperm DNA Fragmentation Analysis

All samples were evaluated using TUNEL and Comet assays. An In Situ Cell Death Detection Kit (Ref. 11684795910, Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Germany) was used for the TUNEL assay as previously described [46]. The semen samples were washed three times in phosphate buffered saline solution (PBS) before adjusting the sperm concentration to  $5 \times 10^6$  cells/mL. Resuspended sperm samples were divided into three 200  $\mu$ L tubes, fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature and then washed in PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The sperm cells were permeabilized using 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 2 min in ice and then washed in PBS supplemented with 1% BSA. The positive control was incubated with 100 IU DNase I (Roche Diagnostic GmbH) for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  while the test sample and the negative control were kept on ice. The three pellets were incubated in 45  $\mu$ L of labelling solution plus 5  $\mu$ L of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme (Roche Diagnostic GmbH) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. The negative control was incubated without TdT enzyme. Finally, samples were washed twice using 1% BSA in PBS. The results were analyzed by flow cytometry with a resuspension of pellet in 1 mL of PBS. Green fluorescence (TUNEL-positive cells) was measured using 530 nm  $\pm$  30 nm band-pass filter for a total of 10,000 events at 200–300 cells/s on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, NJ, USA). Data were processed by CELLQUEST analysis software (Becton Dickinson).

The Comet assay was performed in both alkaline and neutral conditions, according to the methodology previously described by our research group [47]. Samples were washed and adjusted to  $10 \times 10^6$  sperm/mL. The sperm solution was mixed with low-melting-point agarose, fixed on a slide and stored at  $4^\circ\text{C}$  to jelly. After sperm nucleus decondensation by two consecutive lysis solutions, a denaturing treatment in NaOH solution and electrophoresis at 20 V (1 V/Cm) for 4 min in 0.03 M NaOH buffer was performed for the alkaline Comet slide, and electrophoresis for 12.5 min in TBE buffer and a washing in 0.9% NaCl solution was performed for the neutral Comet slide. Then, the slides were washed in a neutralization solution at neutral pH, dehydrated and dried before stain with DAPI SlowFade Gold anti-fade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to classify 400 sperm as fragmented or non-fragmented. The samples were analyzed at CIMAB Barcelona Male Infertility Centre and evaluated by a single researcher under a fluorescence microscope to reduce intra-observer variability. The DNA damage results are given as a percentage of sperm with SDF for each sample (based in the criteria reported before [29]); also as Olive tail moment (OTM) values, obtained with Komet 7 analysis software (Andor, Oxford, UK), thus giving an idea of the DNA damage intensity.

#### 2.4. Sperm Chromatin Condensation Analysis

A sperm chromatin condensation was performed using Chromomycin A3 (CMA3, Sigma-Aldrich) test. CMA3 is a yellow fluorescence molecule that competes with protamines, labelling chromatin with protamine deficiency. The semen samples were washed twice in PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100, and resuspended up to a sperm concentration of  $10^7$  cells/mL. A cellular extension was performed on a slide and air-dried. The staining solution was prepared with 47.5  $\mu$ L McIlvaine buffer solution (18 mL citric acid 0.1 M and 41 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M) freshly mixed with  $\text{MgCl}_2$  at 10 mM, plus 10  $\mu$ L of CMA3 (5 mg/mL). The slide was then incubated with 50  $\mu$ L of staining solution, covered with a coverslip, at room temperature for 20 min in the dark. Then, the coverslip was gently removed and sperm cells were counterstained with DAPI SlowFade Gold antifade (Invitrogen). A total of 400 cells were analyzed under an epifluorescence microscope and evaluated as positive (CMA3 +) or negative (CMA3 -) to obtain the percentage of chromomycin positive cells (Figure 1).



**Figure 1.** Sperm cells slide stained with Chromomycin A3 and counterstained with DAPI SlowFade Gold antifade. Cells with chromatin condensation deficiency are showed in yellow and normal cells in blue.

### 3. Results

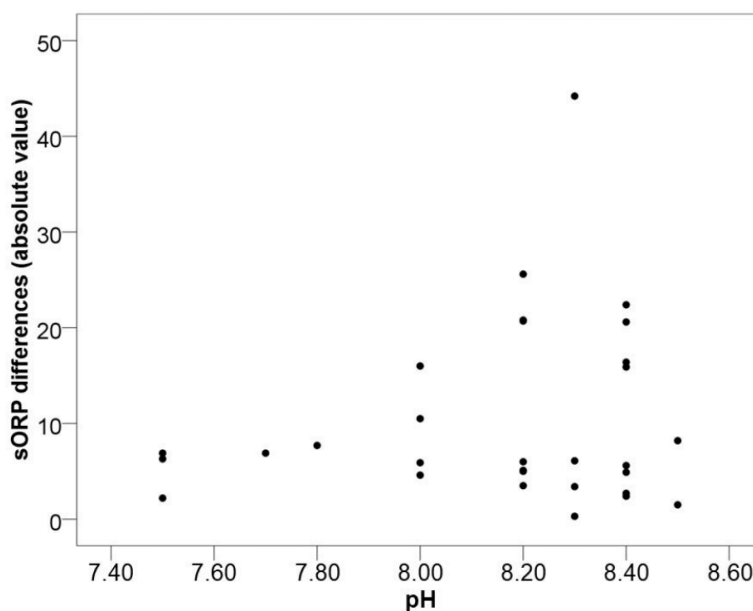
#### 3.1. MiOXSYS Measurements Variability

When performing two consecutive measures and studying their behavior, similar ranges and a very strong correlation was observed between them. However, an analysis for paired samples revealed significant differences between both measures (Table 1). The statistical analysis of sORP differences and seminal parameters did not show any statistically significant correlations, but it was observed that samples with a larger difference between the two measures also showed a pH value  $\geq 8$  (Figure 2).

**Table 1.** Descriptive statistics of first measure (static oxidation-reduction potential 1; sORP 1) and second measure (sORP 2) displayed by the MiOXSYS system and relationship study between them.

Measures	Mean $\pm$ Standard Deviation	95% Confidence Interval
sORP1 ( $n = 37$ )	57.01 $\pm$ 27.32	47.90–66.12
sORP2 ( $n = 32$ ) *	55.71 $\pm$ 25.84	46.39–65.02
Statistical test	Statistical value	<i>p</i> -value
<b>Pearson correlation (sORP1 vs sORP2)</b>	$r = 0.853$	<0.001
<b>Paired samples T-student (sORP1 vs sORP2)</b>	$t = 2.306$	0.028

\* Five samples only presented one measurement because the second one was displayed as too low to give a numerical value by the device.



**Figure 2.** Distribution of differences between sORP1 and sORP2 (absolute values) in idiopathic patients regarding seminal pH values of each sample.

### 3.2. ORP, DNA Damage and DNA Condensation Relationships

All semen samples were evaluated and the values for the following parameters were recorded: ORP, SDF (TUNEL and Comet assays), chromatin condensation deficiencies, seminal viscosity, seminal pH, sperm concentration, total and progressive motility, normal morphology and seminal volume (Table 2). According to manufacturer instructions, values displayed by the MiOXSYS system need to be normalized by the sperm concentration (nsORP-C) and is sensitive to seminal viscosity. Our results show that the system could also be affected by seminal pH, as seen in the previous section. Thus, to reduce the possible impact of these parameters, two more variables have been generated: sORP normalized by viscosity (nsORP-V) and sORP normalized by pH (nsORP-P) (Table 2).



**Table 2.** Distribution of semen parameters in the studied patients.

Semen Parameters	Mean $\pm$ Std. Deviation	95% Confidence Interval
nsORP-C (mV/10 <sup>6</sup> sperm/mL)	3.02 $\pm$ 9.50	−0.35–6.39
nsORP-V (mV/cps)	9.84 $\pm$ 6.33	7.66–12.02
nsORP-P (mV/U pH)	7.05 $\pm$ 3.52	5.86–8.24
TUNEL (%)	42.23 $\pm$ 14.98	37.37–47.09
Alkaline comet (%)	34.33 $\pm$ 15.07	29.64–39.03
OTM alkaline comet	0.82 $\pm$ 0.23	0.75–0.90
Neutral comet (%)	66.17 $\pm$ 15.63	61.3–71.04
OTM neutral comet	0.62 $\pm$ 0.16	0.57–0.68
CMA3 (%)	38.06 $\pm$ 16.51	32.78–43.34
Viscosity (cps)	9.13 $\pm$ 13.34	4.80–13.45
pH	8.13 $\pm$ 0.39	8.01–8.26
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> sperm/mL)	68.14 $\pm$ 57.49	48.97–87.30
Total motility (%)	58.85 $\pm$ 16.50	53.35–64.35
Progressive motility (%)	46.69 $\pm$ 19.03	40.35–53.04
Normal morphology (%)	11.36 $\pm$ 12.74	6.42–16.30
Seminal volume (mL)	3.00 $\pm$ 1.46	2.53–3.46

nsORP-C: ORP normalized by sperm concentration; nsORP-V: ORP normalized by seminal viscosity; nsORP-P: ORP normalized by pH; CMA3: Chromomycin A3 test; OTM: Olive tail moment.

A comparison of seminal parameters and the three ORP variables are shown in Table 3. Interestingly, all three ORP variables showed a negative correlation to percentage of CMA3 positive cells and to seminal viscosity. nsORP-C and nsORP-P were positively correlated with seminal volume. nsORP-V and nsORP-P displayed a negative correlation with total and progressive motility. nsORP-V was negatively correlated with pH. Finally, no correlation was found between the SDF, sperm morphology and concentration.

**Table 3.** sORP correlation analysis with semen and sperm parameters with Pearson's (r) and Spearman's ( $\rho$ ) correlation test as it matches. Confirmation with an inverse curvilinear estimation ( $r^2$ ) in the required case.

Semen Parameters	nsORP-C	nsORP-V	nsORP-P
TUNEL (%)	$\rho = 0.160$	$\rho = 0.173$	$\rho = 0.213$
Alkaline comet (%)	$\rho = 0.125$	$r = -0.005$	$r = 0.061$
OTM alkaline comet	$\rho = -0.039$	$r = -0.252$	$r = 0.125$
Neutral comet (%)	$\rho = -0.249$	$r = 0.036$	$r = -0.054$
OTM neutral comet	$\rho = 0.129$	$\rho = 0.338$	$\rho = -0.028$
CMA3 (%)	$\rho = -0.394^*$	$\rho = -0.545^{**}$	$\rho = -0.337^*$
Viscosity (cps)	$\rho = -0.009$ $r^2 = 0.138^*$	—	$\rho = -0.416^*$
pH	$\rho = -0.002$	$\rho = -0.347^*$	—
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> sperm/mL)	—	$\rho = 0.089$	$\rho = 0.081$
Total motility (%)	$\rho = -0.198$	$r = -0.477^{**}$	$r = -0.355^*$
Progressive motility (%)	$\rho = 0.125$	$r = -0.485^{**}$	$r = -0.445^*$
Normal morphology (%)	$\rho = -0.138$	$\rho = -0.005$	$\rho = 0.163$
Seminal volume (mL)	$\rho = 0.452^{**}$	$r = -0.058$	$r = 0.342^*$

\*  $p$ -value < 0.05; \*\*  $p$ -value < 0.01.

The single-strand SDF values assessed by the alkaline Comet assay exhibited a strong negative correlation with total and progressive motility, both for the SDF cell count and software analysis (OTM alkaline) (Table 4). Sperm morphology and concentration seem to follow a trend line, but it was shown to be not significant. The SDF cell count analyzed by TUNEL and alkaline Comet assays were positive correlated with the CMA3 positive cell count (Table 4), except for five patients with low CMA3 positive cells and high single-strand SDF assessed by the alkaline Comet assay. Double-strand SDF assessed by the neutral Comet assay did not correlate with any of the analyzed parameters. The CMA3

positive cell parameter was positively correlated with seminal pH and negatively correlated with progressive motility and seminal volume (Table 4).

**Table 4.** Sperm DNA fragmentation (SDF) and chromomycin a3 (CMA3) correlation analysis with semen and sperm parameters with Pearson's and Spearman's correlation test as it matches.

Semen Parameters	TUNEL	Alkaline Comet	OTM Alkaline	Neutral Comet	OTM Neutral	CMA3
CMA3 (%)	0.338 *	0.346 *	−0.043	−0.043	−0.230	—
Viscosity (cps)	−0.125	0.321 *	0.390 *	−0.083	−0.463 **	0.202
pH	0.166	−0.165	−0.229	0.004	−0.018	0.395 **
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> sperm/mL)	−0.048	−0.214	−0.106	0.210	−0.197	0.242
Total motility (%)	−0.037	−0.363 *	−0.372 *	0.022	−0.016	−0.024
Progressive motility (%)	−0.384 *	−0.417 **	−0.349 *	−0.059	−0.175	−0.391 *
Normal morphology (%)	0.010	0.080	0.215	−0.161	−0.228	0.099
Seminal volume (mL)	−0.006	−0.147	0.108	−0.300	−0.230	−0.363*

OTM: Olive tail moment; CMA3: Cromomycin A3 test. \* *p*-value < 0.05; \*\* *p*-value < 0.01.

#### 4. Discussion

Oxidative stress has been pinpointed by several authors as one of the biological processes related to fertility failure [11,13,14,16]. In order to understand the mechanisms by which an individual becomes infertile, it is important to define the relationship among the different infertility biomarkers. Since the oxidative status of a semen sample depends both on ROS and antioxidants, seminal oxidative state assessments must take into account the levels of both agents present in the seminal plasma. In this sense, the ORP values measured by the MiOXSYS system have been proposed as a good biomarker to assess this redox balance [15,48]. Still, the relationship of this system with other seminal parameters is not yet well defined. The aim of this study is to establish whether a relationship exist between the ORP values and sperm DNA fragmentation and chromatin compaction, and to assess the possible effect of parameters on MiOXSYS system measurements.

##### 4.1. MiOXSYS Measurements Variability

Several authors have indicated the influence of seminal viscosity over the MiOXSYS reading outcome as its main disadvantage [23,24]. However, according to the device's developers, stable, reproducible and reliable results are regularly achieved for each individual, both on fresh and cryopreserved samples [21,49,50]. Despite the good reproducibility described, our results suggest that, beside viscosity, other seminal parameters might be influencing the reading outcome.

After performing two consecutive measurements, results showed that even though there was a correlation between the two measurements, a significant variation was found between them (Table 1). In order to find the cause of this variability, differences between the two sORPs per sample were compared with all the assessed seminal parameters. As shown in Figure 2, the higher the seminal pH, the greater the number of samples with discernible differences between the two MiOXSYS measurements. Interestingly, nsORP-C did not correlate with pH, possibly meaning that sperm count has an important influence on results and that an ejaculate dilution could affect the redox state of the diluted sample.

The MiOXSYS system is an electrochemical method that evaluates the flow of electrons through a galvanostatic sensor. Therefore, it is possible that changes in the number of protons present in the seminal plasma affect the reading outcome. In general, any aqueous solution increases its electrical conductivity the more ions it contains [51–53]. Thus, low or high pH values increase electrical conductivity with respect to a neutral pH, possibly altering a sample's electrical potential measurements. Here we show that the sORP measurement's reproducibility is affected in samples with alkaline pH values  $\geq 8$ . Starting at pH 8, differences of more than 10 mV between the two sample

measurements can be found, reaching up to 44 mV in one case (Figure 2). Further research increasing the number of measurements and samples analyzed should be performed in order to determine the extent of seminal pH influence on the MiOXSYS system reproducibility and the need to include pH value in the normalization algorithm in addition to sperm concentration and viscosity.

#### 4.2. Sperm Parameters Relationship

Seminal quality appears to be actively affected by oxidative stress. It apparently plays a central role in the activation or regulation of several mechanisms involved in fertility [13–16]. Correlations between sORP and semen parameters included in the diagnostic guidelines issued by the WHO in 2010 [43] have already been described. Thus, it has been described that sORP presents a negative correlation with motility, morphology, concentration and volume [45,54,55], meaning that when seminal plasma ORP increases, semen quality decreases. When compared to motility, the three different normalized ORP measures of our study showed correlation coefficients similar to those observed by other authors [45,55]. However, nsORP-C correlations did not achieve statistical significance, probably due to the limited sample size. We did observe a significant positive correlation of nsORP-C and nsORP-P with the seminal volume, a relationship that is explained below. No correlation was found with morphology or sperm concentration (Table 3).

On the other hand, our results show a negative correlation between ORPs and viscosity and also between nsORP-V and pH (Table 3), reinforcing the results described in the previous section regarding measures' variabilities.

Interestingly, the highest correlation was found when analyzing the relationship between sORP values and the percentage of CMA3 positive cells (Table 4). According to our results, the DNA condensation degree of sperm chromatin is negatively correlated with all three sORP variables, so that the higher the oxidative stress, the fewer cells with altered chromatin compaction. This apparently contradictory result could be explained by the fact that alterations in histone–protamine exchange occur during spermiogenesis in testis. According to the double-step hypothesis proposed by Aitken and De Iuliis [42,56], a defect in DNA condensation would be the first step that would facilitate greater access to ROS, leading to extensive DNA damage. For this reason, a positive correlation is found between the number of sperm with single-strand DNA fragmentation (Alkaline Comet and TUNEL assays) and with compaction alterations assessed by CMA3 (Table 4), in accordance with the previous studies of our group [36] and other authors [38,39]. Then, in epididymis, ROS levels would be balanced by providing antioxidants to generate a suitable conservation medium for sperm. Any alteration in this antioxidant contribution would maintain high levels of ROS all the way through vas deferens, generating even more DNA damage. Finally, to counterbalance this oxidative environment, a lot of seminal liquid would be added to dilute the ROS presence along with large amounts of antioxidants, resulting in a low ORP and high seminal volume. In individuals with basal or slightly raised levels of testicular ROS and without alterations in the histone–protamine exchange, fewer antioxidants would be supplied in the seminal fluid, resulting in a comparatively higher ORP than in the previous case.

The results for DNA integrity suggest no direct correlation between seminal oxidation-reduction potential and fragmentation of sperm DNA, as assessed by either TUNEL or Comet assays (Table 4). Previous studies have shown a direct relationship between ROS levels and single-strand SDF [10,33,34]. The lack of a similar relationship between sORP and SDF suggests that, similarly to what has been commented on the previous paragraph, the incorporation of antioxidants in seminal plasma compensates for testicular ROS levels. High levels of ROS can be offset by high levels of antioxidants that prevent SDF generation, and conversely, basal ROS levels along with a decrease in seminal antioxidants could lead to increased SDF [17–20]. The SDF generated by ROS occurs mainly in the epididymis and vas deferens but not in the ejaculation stage [57–59]. SDF can also be produced by intracellular ROS [60]. Further, there are seemingly contradictory results where some authors observed a positive correlation using a sperm chromatin dispersion test [61–63] but another did not find it using

a sperm chromatin structure assay [34]. The disparity of techniques used can become biased when comparing results.

Even so, TUNEL and Comet alkaline assays negatively correlate with sperm motility and, in the case of computational analysis of alkaline comet assay, with morphology (Table 4), an association with seminal quality which has been previously described [25–28,30,33].

According to previous analysis of our group [36], post-ejaculation SDF dynamics is highly variable in both control and infertile patients. Regardless of baseline levels, the generation of new SDF in ejaculate is very different in all studied groups [64,65]. This dynamic could be explained by the interindividual variability observed with sORP, with high sORP individuals generating new SDF over prolonged seminal plasma exposure. In this sense, the analysis of the ORP may be useful in programming the ejaculate management during an assisted reproduction process or research project, such as a rapid isolation of the sperm cells from seminal plasma in high sORP samples to avoid an increase in SDF.

## 5. Conclusions

The tendency observed between sORP1–sORP2 differences and the pH value suggests that, together with seminal viscosity, pH might be affecting the reading outcome of the MiOXSYS system. Further studies will be needed to establish the effect of the seminal pH on the system's reliability. A negative relationship has been found between the ORP values and the state of sperm chromatin compaction, as well as with seminal quality, but not with SDF. These relationships have allowed us to contribute new information that supports the model proposed by Aitken and De Iuliis on the origin of DNA damage. Finally, our work shows that the combined knowledge of SDF, chromatin compaction and sORP may have relevant clinical applications, particularly when choosing the most appropriate strategy for handling seminal samples in assisted reproduction processes.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.G.-S., M.O.-B. and J.B.; Sample resources, M.O.-B. and A.B.C.; Methodology, S.G.-S.; Comet assay methodology, J.R.-M. and S.L.-C.; Statistical Analysis and Writing—Original Draft Preparation, S.G.-S.; Writing—Review and Editing, J.B., M.O.-B., J.R.-M., A.G.-P.; Funding Acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the European Regional Development Fund and Instituto de Salud Carlos III (Economy, Industry and Competitiveness Ministry, Madrid, Spain; Project PI14/00119) and Generalitat de Catalunya (Project 2017SGR1796). Comet assay was funded by CIMAB, Barcelona Male Infertility Centre.

**Acknowledgments:** Authors would like to thank Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) of Universitat Autònoma de Barcelona, for the service provided for the FACSCalibur cytometer. Additionally, to physicist college S. Tablero for his assistance in understanding the relationship between pH and electrical conductivity.

**Conflicts of Interest:** A.G.-P. has commercial interests with the comet test. Other authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. De-Kretser, D.M. Male infertility. *Lancet* **1997**, *349*, 787–790. [[CrossRef](#)]
2. Hamada, A.; Esteves, S.C.; Nizza, M.; Agarwal, A. Unexplained male infertility: Diagnosis and management. *Int. Braz. J. Urol.* **2012**, *38*, 576–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Louis, J.F.; Thoma, M.E.; Sørensen, D.N.; McLain, A.C.; King, R.B.; Sundaram, R.; Keiding, N.; Louis, G.M.B. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: Evidence from a nationally representative sample. *Andrology* **2013**, *1*, 741–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kumar, N.; Singh, A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J. Hum. Reprod. Sci.* **2015**, *8*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lewis, S.E.M. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* **2007**, *134*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Van Der Steeg, J.W.; Steures, P.; Eijkemans, M.J.C.; Habbema, J.D.F.; Hompes, P.G.A.; Kremer, J.A.M.; Van Der Leeuw-Harmsen, L.; Bossuyt, P.M.M.; Repping, S.; Silber, S.J.; et al. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 1013–1019. [[CrossRef](#)]
7. Wang, C.; Swerdloff, R.S. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 1502–1507. [[CrossRef](#)]
8. Gelbaya, T.A.; Potdar, N.; Jeve, Y.B.; Nardo, L.G. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet. Gynecol. Surv.* **2014**, *69*, 109–115. [[CrossRef](#)]
9. de Lamirande, E.; Gagnon, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 157–166. [[CrossRef](#)]
10. Wright, C.; Milne, S.; Leeson, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod. BioMed. Online* **2014**, *28*, 684–703. [[CrossRef](#)]
11. Du Plessis, S.S.; Agarwal, A.; Halabi, J.; Tvrdá, E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2015**, *32*, 509–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Agarwal, A.; Roychoudhury, S.; Sharma, R.; Gupta, S.; Majzoub, A.; Sabanegh, E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: Clinical utility in male factor infertility. *Reprod. BioMed. Online* **2017**, *34*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* **2017**, *84*, 1039–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Walczak-Jedrzejowska, R.; Wolski, J.K.; Slowikowska-Hilczler, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent. Eur. J. Urol.* **2013**, *66*, 60–67. [[CrossRef](#)]
15. Agarwal, A.; Bui, A.D. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. *Investig. Clin. Urol.* **2017**, *58*, 385. [[CrossRef](#)]
16. Dada, R. Oxidative stress Major executioner in disease pathology role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front. Biosci.* **2017**, *9*, 495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. de Lamirande, E.; Gagnon, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 15–21. [[CrossRef](#)]
18. Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.; Agarwal, A. The reactive oxygen species—Total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 2801–2807. [[CrossRef](#)]
19. Roychoudhury, S.; Sharma, R.; Sikka, S.; Agarwal, A. Diagnostic application of total antioxidant capacity in seminal plasma to assess oxidative stress in male factor infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2016**, *33*, 627–635. [[CrossRef](#)]
20. Ribas-Maynou, J.; Yeste, M. Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology* **2020**, *9*, 77. [[CrossRef](#)]
21. Agarwal, A.; Sharma, R.; Roychoudhury, S.; Du Plessis, S.; Sabanegh, E. MiOXSYS: A novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 566–573.e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Agarwal, A.; Henkel, R.; Sharma, R.; Tadros, N.N.; Sabanegh, E. Determination of seminal oxidation-reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility. *Andrologia* **2018**, *50*, e12914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Agarwal, A.; Bui, A.D. Oxidation-Reduction Potential Methodology Using the MiOXSYS System. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 217–224, ISBN 9780128125014.
24. Rana, M.; Agarwal, A. Seminal Oxidation-Reduction Potential. In *Male Infertility*; Parekattil, S.J., Esteves, S.C., Agarwal, A., Eds.; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2020; pp. 377–387, ISBN 978-3-030-32299-1.
25. Evenson, D.P.; Larson, K.L.; Jost, L.K. 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. [[CrossRef](#)]
26. Zini, A.; Boman, J.M.; Belzile, E.; Ciampi, A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 2663–2668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lewis, S.E.M.; Simon, L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum. Fertil.* **2010**, *13*, 201–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Sharma, R.K.; Sabanegh, E.; Mahfouz, R.; Gupta, S.; Thiyagarajan, A.; Agarwal, A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* **2010**, *76*, 1380–1386. [[CrossRef](#)]
29. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Abad, C.; Amengual, M.J.; Navarro, J.; Benet, J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 652–658. [[CrossRef](#)]
30. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Fernández-Encinas, A.; Amengual, M.J.; Prada, E.; Cortés, P.; Navarro, J.; Benet, J. Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44679. [[CrossRef](#)]
31. Ribas-Maynou, J.; Benet, J. Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes* **2019**, *10*, 105. [[CrossRef](#)]
32. Ribas-Maynou, J.; García-Peiró, A.; Fernández-Encinas, A.; Abad, C.; Amengual, M.J.; Prada, E.; Navarro, J.; Benet, J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* **2013**, *1*, 715–722. [[CrossRef](#)]
33. Javed, A.; Talkad, M.S.; Ramaiah, M.K. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: A comparison of their predictive power for male infertility. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **2019**, *46*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Homa, S.T.; Vassiliou, A.M.; Stone, J.; Killeen, A.P.; Dawkins, A.; Xie, J.; Gould, F.; Ramsay, J.W.A. A comparison between two assays for measuring seminal oxidative stress and their relationship with sperm DNA fragmentation and semen parameters. *Genes* **2019**, *10*, 236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. De Iuliis, G.N.; Thomson, L.K.; Mitchell, L.A.; Finnie, J.M.; Koppers, A.J.; Hedges, A.; Nixon, B.; Aitken, R.J. DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress1. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 517–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. García-Peiró, A.; Oliver-Bonet, M.; Navarro, J.; Abad, C.; Guitart, M.; Amengual, M.J.; Gosálvez, J.; Benet, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int. J. Androl.* **2011**, *34*, 546–553. [[CrossRef](#)]
37. Oliva, R.; Castillo, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J. Androl.* **2011**, *13*, 24–30. [[CrossRef](#)]
38. Mozdarani, H.; Nili, H.A.; Aleyasin, A. Correlation of sperm DNA damage with protamine deficiency in Iranian subfertile men. *Reprod. BioMed. Online* **2009**, *18*, 479–485. [[CrossRef](#)]
39. Atshan, M.; Kakavand, K.; Hosseini, S.H.; Gilani, M.A.S.; Meybodi, A.M.; Sabbaghian, M. Evaluation of sperm DNA fragmentation and chromatin structure in infertile men with immotile short-tail sperm defect. *Andrologia* **2020**, *52*, e13445. [[CrossRef](#)]
40. Ozkosem, B.; Feinstein, S.I.; Fisher, A.B.; O'Flaherty, C. Absence of Peroxiredoxin 6 Amplifies the Effect of Oxidant Stress on Mobility and SCSA/CMA3 Defined Chromatin Quality and Impairs Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2016**, *94*, 68. [[CrossRef](#)]
41. Oumaima, A.; Tesnim, A.; Zohra, H.; Amira, S.; Ines, Z.; Sana, C.; Intissar, G.; Lobna, E.; Ali, J.; Meriem, M. Investigation on the origin of sperm morphological defects: Oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 13775–13786. [[CrossRef](#)]
42. Aitken, R.J.; De Iuliis, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16*, 3–13. [[CrossRef](#)]
43. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010; ISBN 9789241547789.
44. Rijnders, S.; Bolscher, J.G.M.; McDonnell, J.; Vermeiden, J.P.W. Filling Time of a Lamellar Capillary-Filling Semen Analysis Chamber Is a Rapid, Precise, and Accurate Method to Assess Viscosity of Seminal Plasma. *J. Androl.* **2007**, *28*, 461–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Agarwal, A.; Selvam, M.P.; Arafa, M.; Okada, H.; Homa, S.; Killeen, A.; Balaban, B.; Saleh, R.; Armagan, A.; Roychoudhury, S.; et al. Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian J. Androl.* **2019**, *21*, 565–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. García-Peiró, A.; Ribas-Maynou, J.; Oliver-Bonet, M.; Navarro, J.; Checa, M.A.; Nikolaou, A.; Amengual, M.J.; Abad, C.; Benet, J. Multiple Determinations of Sperm DNA Fragmentation Show That Varicocele Is Not Indicated for Infertile Patients with Subclinical Varicocele. *BioMed Res. Int.* **2014**. [[CrossRef](#)]

47. Casanovas, A.; Ribas-Maynou, J.; Lara-Cerrillo, S.; Jimenez-Macedo, A.R.; Hortal, O.; Benet, J.; Carrera, J.; García-Peiró, A. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertil. Steril.* **2019**, *111*, 699–707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Martins, A.D.; Agarwal, A. Oxidation reduction potential: A new biomarker of Male infertility. *Panminerva Med.* **2019**, *61*, 108–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Agarwal, A.; Arafa, M.; Chandrakumar, R.; Majzoub, A.; Al Said, S.; Elbardisi, H. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method. *Andrology* **2017**, *5*, 939–945. [[CrossRef](#)]
50. Agarwal, A.; Sharma, R.; Henkel, R.; Roychoudhury, S.; Sikka, S.C.; du Plessis, S.; Sarda, Y.B.; Speyer, C.; Nouh, M.; Douglas, C.; et al. Cumene hydroperoxide induced changes in oxidation–reduction potential in fresh and frozen seminal ejaculates. *Andrologia* **2018**, *50*. [[CrossRef](#)]
51. Shackelford, C.D.; Malusis, M.A.; Majeski, M.J.; Stern, R.T. Electrical conductivity breakthrough curves. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* **1999**, *125*, 260–270. [[CrossRef](#)]
52. Leveling, T. *The Relationship between pH and Conductivity in a Lithium Contaminated, De-Ionized Water System*; FERMILAB-PBAR-NOTE-674; Fermilab: Batavia, IL, USA, 2002; pp. 1–11.
53. Ouhadi, V.; Goodarzi, A. Factors impacting the electro conductivity variations of clayey soils. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. B Eng.* **2007**, *31*, 109–121.
54. Arafa, M.; Agarwal, A.; Al Said, S.; Majzoub, A.; Sharma, R.; Bjugstad, K.B.; Al Rumaihi, K.; Elbardisi, H. Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation-reduction potential. *Andrologia* **2018**, *50*. [[CrossRef](#)]
55. Majzoub, A.; Arafa, M.; El Ansari, W.; Mahdi, M.; Agarwal, A.; Al-Said, S.; Elbardisi, H. Correlation of oxidation reduction potential and total motile sperm count: Its utility in the evaluation of male fertility potential. *Asian J. Androl.* **2020**, *22*, 317–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Aitken, R.J.; De Iulii, G.N.; McLachlan, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* **2009**, *32*, 46–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sakkas, D.; Alvarez, J.G. Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.* **2010**, *93*, 1027–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gawecka, J.E.; Boaz, S.; Kaspersen, K.; Nguyen, H.; Evenson, D.P.; Ward, W.S. Luminal fluid of epididymis and vas deferens contributes to sperm chromatin fragmentation. *Hum. Reprod.* **2015**, *30*, 2725–2736. [[CrossRef](#)]
59. Xie, P.; Keating, D.; Parrella, A.; Cheung, S.; Rosenwaks, Z.; Goldstein, M.; Palermo, G.D. Sperm Genomic Integrity by TUNEL Varies throughout the Male Genital Tract. *J. Urol.* **2020**, *203*, 802–808. [[CrossRef](#)]
60. Mayorga-Torres, B.J.M.; Camargo, M.; Cadavid, P.; du Plessis, S.S.; Maya, W.D.C. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *Andrologia* **2017**, *49*, e12659. [[CrossRef](#)]
61. Elbardisi, H.; Finelli, R.; Agarwal, A.; Majzoub, A.; Henkel, R.; Arafa, M. Predictive value of oxidative stress testing in semen for sperm DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test. *Andrology* **2020**, *8*, 610–617. [[CrossRef](#)]
62. Tanaka, T.; Kobori, Y.; Terai, K.; Inoue, Y.; Osaka, A.; Yoshikawa, N.; Shimomura, Y.; Suzuki, K.; Minami, T.; Iwahata, T.; et al. Seminal oxidation–reduction potential and sperm DNA fragmentation index increase among infertile men with varicocele. *Hum. Fertil.* **2020**. [[CrossRef](#)]
63. Majzoub, A.; Arafa, M.; Mahdi, M.; Agarwal, A.; Al Said, S.; Al-Emadi, I.; El Ansari, W.; Alattar, A.; Al Rumaihi, K.; Elbardisi, H. Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab J. Urol.* **2018**, *16*, 87–95. [[CrossRef](#)]
64. Tvrdá, E.; Arroyo, F.; Gosálvez, J. Dynamic assessment of human sperm DNA damage I: The effect of seminal plasma-sperm co-incubation after ejaculation. *Int. Urol. Nephrol.* **2018**, *50*, 1381–1388. [[CrossRef](#)]
65. Gosálvez, J.; Cortés-Gutiérrez, E.; López-Fernández, C.; Fernández, J.L.; Caballero, P.; Nuñez, R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 170–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

