

Impacto del ácido ascórbico y su correlación con la reacción acrosomal, movilidad espermática, acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster

Etelberto López Rivadeneyra,* Bronte Stone,** Carlos Navarro Martínez,* Richard P Marrs**

RESUMEN

Objetivo: Determinar si el uso del ácido ascórbico (AA) actúa como tratamiento protector antioxidante de la integridad del ADN del espermatozoide. Se valoró la movilidad espermática, la reacción acrosomal, la prueba de penetrancia en huevo de hámster y la integridad del ADN con la tinción de acridina naranja. **Material y método:** La muestra de esperma de 10 pacientes bajo estudio de infertilidad fue suplementada con AA a diferentes concentraciones con la finalidad de encontrar la dosis terapéutica y tóxica en el espermatozoide. Durante 48 horas de incubación se analizaron la muestra de esperma de 52 pacientes estudiados por infertilidad. Se realizó una dilución de 40 millones de espermatozoides/mL y se dividió en cuatro grupos: control (grupo 1), 300 μ M AA (grupo 2), 50% líquido folicular de paciente donadora de óvulos (grupo 3), 50% líquido folicular de paciente con IVF sin éxito (grupo 4). **Resultados:** La supervivencia y movilidad espermática, $67 \pm 3\%$, lograda con la suplementación de 300 μ M de AA mostraron una significativa relación positiva en la movilidad después de 24 horas ($p < 0.005$) con el suplemento de AA. El porcentaje de reacción acrosomal después de 24 horas de incubación fue de 35.35 ± 2.2 y de 50.1 ± 3.1 después de 48 horas ($p < 0.001$) sin diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. A las 24 horas de tratamiento, el porcentaje de integridad del ADN fue de 82.72 ± 1.78 y después de 48 horas de 92.66 ± 1.76 ($p < 0.001$), no siendo estadísticamente significativo con el tratamiento. Después de 24 horas, en el 60% de los casos el número de huevos penetrados y el número de penetraciones fue mayor en el grupo de AA que en el control; sin embargo, no existió diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento. **Conclusiones:** Después de 24 horas de incubación en el medio con AA, se incrementa la movilidad espermática y la reacción acrosomal. Es posible el uso de AA como inductor de reacción acrosomal y como protector de la integridad del ADN. La diferencia en la prueba de penetrancia en huevo de hámster no fue estadísticamente significativa en el grupo de AA; sin embargo, el efecto en el número de huevos penetrados y el número de penetraciones está presente. Nosotros consideramos que al incrementar el número de pacientes la diferencia será significativa.

Palabras clave: Ácido ascórbico, movilidad espermática, reacción acrosomal, acridina naranja, antioxidante.

ABSTRACT

Objective: To determine the use of ascorbic acid (AA) as an antioxidant treatment protects DNA spermatozoa integrity; sperm motility and acrosomal reaction. **Design:** Through 48 hr incubation control (group 1), 300 μ M AA (group 2), 50% follicular fluid egg donor (group 3), 50% follicular fluid IVF failed patient (group 4) spermatozoa of 52 patients under infertility study were analyzed and compared. **Results:** Motile sperm survival $67 \pm 3\%$ at 300 μ M AA, spermatozoa supplementation with AA showed a significant positive relationship of motility after 24 hr ($p < 0.005$) with AA treatment. The percentage of acrosomal reaction after 24 h incubation was 35.35 ± 2.2 and 50.1 ± 3.1 after 48 h ($p < 0.001$) there were insignificant with the treatment. After 24 hr treatment the percentage of DNA integrity was 82.72 ± 1.78 and after 48 hrs 92.66 ± 1.76 ($p < 0.001$) there were no significant difference with the treatment. After 24 hr in 60% of cases the number of ova penetrated and number of penetrations were higher in AA group than control however there was no significant difference with the treatment. **Conclusions:** After 24 h incubation ascorbic acid increases the motility of spermatozoa and increases the acrosomal reaction. It is possible to use the AA as inductor of acrosomal reaction and as protector of DNA integrity. The difference at the SPA was statistically significant in AA group; however, the effect in the number of ova penetrated and number of penetrations are present and we consider that if we increase the number of patients the difference will be significant.

Key words: Ascorbic acid, sperm motility, acrosomal reaction, acridine orange, antioxidant.

* Centro de Reproducción Humana e Infertilidad. México D.F.

** California Fertility Associates. Santa Mónica, California.

Recibido para publicación: 20/04/01. Aceptado para publicación: 19/06/01.

Dirección para correspondencia: Dr. Etelberto López Rivadeneyra
Sur 132 núm. 108 consultorio 107, Col Las Américas, 01120 México D.F.

INTRODUCCION

Las bases del ácido desoxirribonucleico (ADN) y los enlaces fosfodiéster son susceptibles al estrés oxidativo. La peroxidación nuclear puede causar rompimientos en los enlaces del ADN, dando como resultado alteraciones de la transcripción, translación y replicación del ADN.^{1,2} El espermatozoide humano puede generar especies reactivas de oxígeno (ERO), así como aniones superóxido. Bajo la acción de la superóxido dismutasa,⁵ estos aniones son convertidos a peróxido los cuales inducen daño oxidativo al espermatozoide.⁴ Las especies reactivas de oxígeno también están relacionadas con la infiltración de leucocitos al líquido seminal.⁶

La exposición del espermatozoide a las especies reactivas de oxígeno están asociadas con disminución en la movilidad, disminución en la fusión espermatozoide-ovocito^{7,8} y con incremento en la incidencia de los defectos en la morfología.⁹

El ácido ascórbico (AA) en el líquido seminal estabiliza el ADN a través de una acción antioxidante.¹³ La deficiencia de AA en el líquido seminal ha sido relacionada con un incremento oxidativo y daño al ADN.¹⁴

Los niveles bajos de AA en el semen están asociados con un incremento en la aglutinación y anomalías espermáticas, así como con reducción en la cuenta y movilidad espermáticas.^{17,18} La mejoría de dichas características ha sido observada con el suplemento de AA, siendo la respuesta proporcional a la dosis diaria.¹⁹

Se ha establecido, entonces, una relación positiva entre el AA y la morfología espermática normal y una relación inversa entre el AA y la generación de especies reactivas de oxígeno.^{15,16,20}

Se ha encontrado que el AA es el único agente antioxidante endógeno en el plasma sanguíneo que puede proteger completamente a las lipoproteínas contra el daño peroxidativo inducido por los radicales peróxido y los oxidantes liberados por los leucocitos polimorfonucleares activados.²¹

Después de la administración de AA por vía oral (200 mg) durante cuatro semanas ha sido estudiado el efecto del AA, encontrándose un incremento del 24% en la cuenta espermática, 18% en la movilidad y 24% en la viabilidad. Administrado en dosis de 100 mg se encontró un incremento del 34% en la cuenta espermática, 5% en la movilidad y 34% en la viabilidad.²²

El objetivo de este trabajo fue examinar la toxicidad potencial del AA sobre el espermatozoide humano y los efectos del incremento en la concentración del AA en la función espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

A una muestra de 62 pacientes que estaban en estudio de infertilidad se les realizó prueba de toxicidad de AA, capacitación espermática, detección de reacción acrosomal, tinción de acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster.

En 10 de los 62 pacientes se determinó la concentración tóxica y terapéutica del AA en el espermatozoide. A las muestras de espermatozoide de 52 sujetos se les practicó capacitación espermática, detección de reacción acrosomal, tinción de acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster.

Toxicidad del ácido ascórbico

La muestra de espermatozoide de 10 pacientes fue procesada y capacitada con percoll y resuspendida a una concentración final de 40 millones de espermatozoides/mL en bicarbonato HTF que contenía 5% (V/V) de sustituto sintético de albúmina (SSA). Cada suspensión fue mezclada y diluida por dos para obtener una concentración final de 1-1 AA (sal sódica, SIGMA normal, culture grade) de 0 (control), 75, 150, 300, y 600 μ M.

Al tiempo cero y después de tres revisiones consecutivas cada 24 horas, a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ en el aire, se determinó la concentración de espermatozoides móviles (CASA). Posteriormente, el porcentaje de supervivencia de los espermatozoides móviles fue analizado factorialmente con ANOVA (día de cultivo X, concentración de AA).

Muestras de espermatozoide

En 52 pacientes, la muestra de espermatozoide fue colectada por masturbación en contenedores estériles después de un periodo de abstinencia sexual de al menos 72 horas, dejándose licuar por 30 minutos. Una vez licuado el eyaculado, se analizó con los parámetros estándar para muestras de espermatozoide establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992). Las muestras de espermatozoide fueron procesadas con un medio de gradientes de percoll modificado (1 mL de cada uno de 90% y 55% V/V soluciones preparadas con percoll isotónico al 90%; Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) y resuspendidas a una concentración final de 20 millones de espermatozoides móviles/mL en bicarbonato HTF que contenía 5% (V/V) de sustituto sintético de albúmina (SSA). Cada suspensión fue entonces mezclada por 2 a una concentración final de 1-1 AA (sal sódica, SIGMA) de: grupo 1, 0 (control); grupo 2, 300 μ M AA; grupo 3, 50% líquido folicular, proveniente de donadora de óvulos joven; y grupo 4,

50% de líquido folicular proveniente de paciente añosa de programa de fertilización. Se utilizó pentoxifilina durante la capacitación a una concentración estándar de 6 mM en 100 mL de medio modificado HTF.

Después del tiempo 0, 24 horas y 48 horas, a 37° C y 5% de CO₂ en el aire, se analizó la concentración de espermias móviles con el método de análisis de espermático medido por computadora (CASA), tinción de reacción acrosomal, tinción de acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster (PPHH).

Detección de reacción acrosomal

Se fijó una muestra de 100 µL de la preparación de espermia en 1 mL de glutaraldehído (3% PBS, pH 7.4) en tubos cónicos al menos por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados (en agua destilada, 1,000 g, durante dos minutos), la preparación de espermia fue resuspendida en 30 a 50 µL de agua destilada y expandida en una laminilla. Ésta fue teñida con café de Bismark (0.8%) en agua desionizada (pH 1.8) por 10 minutos a 37° C y lavada cinco veces (dos minutos en cada ocasión) en agua destilada en jarras de Coplin. Las laminillas se secaron al medio ambiente y posteriormente se tiñeron con rosa de bengala (0.8% en 0.1 M buffer, pH 5.3) por 25 minutos a temperatura ambiente. Después de un segundo lavado (cinco veces por dos minutos con agua destilada), la tinción de espermia fue deshidratada en 50, 95 y 100% de etanol (un minuto cada una) y lavada finalmente con xileno.

La tinción de color rosa de la región acrosomal establece membrana acrosomal espermática intacta; mientras que la región acrosomal pálida o con rosa de bengala es típica de la reacción acrosomal espermática. Al menos 200 espermias fueron contados bajo aceite de inmersión.

Acridina naranja

Se prepararon laminillas con cada medio secándose a temperatura ambiente por 20 minutos. La laminilla se fijó con solución de Carnoy's (tres partes de metanol por una parte de ácido acético), permaneciendo en dicha solución hasta el día siguiente. Las laminillas fueron retiradas del fijador, dejándose secar a temperatura ambiente.

La solución de Stock consiste en 1 g de acridina naranja (Aldrich Chemical Company, No. Cat. 15855-0) en 1000 mL de agua destilada. Para preparar la solución de tinción se utilizan 10 mL de la solución de Stock más 40 mL de ácido cítrico a 0.1 M y 2.5 mL de Na₂HPO₄·7H₂O a 0.3 M. El pH final de la tinción es de 2.5 con

una concentración de 0.19 mg/mL. La solución de tinción se preparó diariamente.

La solución de tinción fue esparcida en cada laminilla por cinco minutos y posteriormente retirada con abundante agua desionizada. Antes de que éstas se secaran, se colocó un cubre objetos delgado sobre cada una. El cubre objetos fue entonces sellado con barniz para uñas.

Las laminillas fueron observadas el mismo día con microscopio de fluorescencia, utilizando un filtro de excitación de 490-nm y filtros de barrera de 530-nm.²³

Las cabezas de los espermias normales se observan teñidos de color verde (espermatozoides con ADN íntegro), los cuales se distinguen de aquellos sin tinción o con color que varía del amarillo, naranja o rojo (espermatozoides con ADN alterado).

Prueba de penetrancia en huevo de hámster (PPHH)

Posterior a 24 horas de incubación, las muestras de espermia del grupo 1 (control) y del grupo 2 (AA) fueron preparadas y diluidas a una concentración de 10 millones de espermias móviles/mL. De esta preparación, 100 µL fueron administrados en cada plato de medio de cultivo que contenía 10 huevos de hámster en medio HTF modificado con HEPES y 10% de sustituto sintético de albúmina (SSA). Se realizó el procedimiento estándar utilizado para reclutar y procesar huevos de hámster para dicha prueba.²⁴

Análisis estadístico

Se empleó análisis estadístico de dos factores de repetición y análisis de varianza (ANOVA). Todos los resultados fueron presentados en su forma original. La significancia estadística fue definida con una $p < 0.005$. Cuando ANOVA detectó cambios significativos, se utilizó prueba de t de Student para comparaciones subsecuentes.

RESULTADOS

Efecto del ácido ascórbico

El estudio realizado a través de ANOVA demostró que posterior a 24 horas de cultivo se observó que, en ausencia de AA, el $79 \pm 5\%$ de los espermias móviles sobrevivieron. A una concentración de 300 µM de AA, la concentración y supervivencia espermática se incrementó en $67 \pm 3\%$ ($p < 0.0001$).

La movilidad y supervivencia espermática disminuyó conforme se incrementó la dosis de AA.

A una concentración de 300 µM se observó 10% menos en la movilidad y progresión que a 600 µM; sin em-

bargo, a una concentración de 600 μM de AA, la supervivencia espermática se encuentra afectada ($p < 0.05$).

Movilidad espermática

Después de 24 horas de cultivo en un medio suplementado con 300 μM de AA, se observó una mayor movilidad espermática que en el grupo control y los grupos suplementados con líquido folicular ($p < 0.005$) (Figura 1).

Reacción acrosomal (RA)

Con el método de ANOVA se observó un incremento estadísticamente significativo en la reacción acrosomal con los diversos tratamientos ($p < 0.0001$); sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p = 0.21$), ni entre el tiempo del tratamiento ($p = 0.84$). Los cambios en la reacción acrosomal durante el cultivo se observan en la figura 2.

Integridad del ADN; tinción con acridina naranja

A través de la prueba de ANOVA se registró un incremento estadísticamente significativo en la proporción de espermatozoides acridina naranja positivos en relación al tiempo de cultivo ($p < 0.001$); sin embargo, el efecto entre los tratamientos no fue significativo ($p = 0.5$) y tampoco en relación al tiempo de tratamiento ($p = 0.4$) (Figura 3).

Prueba de penetrancia en huevo de hámster (PPHH)

La prueba de penetrancia en huevo de hámster fue realizada posterior a un cultivo de 24 horas en HTF modifica-

do con HEPES suplementado con 300 μM de AA. El porcentaje de pruebas de penetración positivas en el grupo de AA fue de 91 ± 5 y de 32 ± 4 en el grupo control. ($p < 0.0001$). El porcentaje de huevos de hámster penetrados por muestra fue de 5.7 ± 1.1 en el grupo de AA y de 4.35 ± 0.9 para el grupo control ($p = 0.3$). El porcentaje de penetraciones en cada huevo de hámster fue de 1.4 ± 0.2 en el grupo de AA y de 1.1 ± 0.1 para el grupo control.

DISCUSIÓN

Se han encontrado que las especies reactivas de oxígeno funcionan en múltiples células como segundos mensajeros y que una de las mayores causas de afección de la

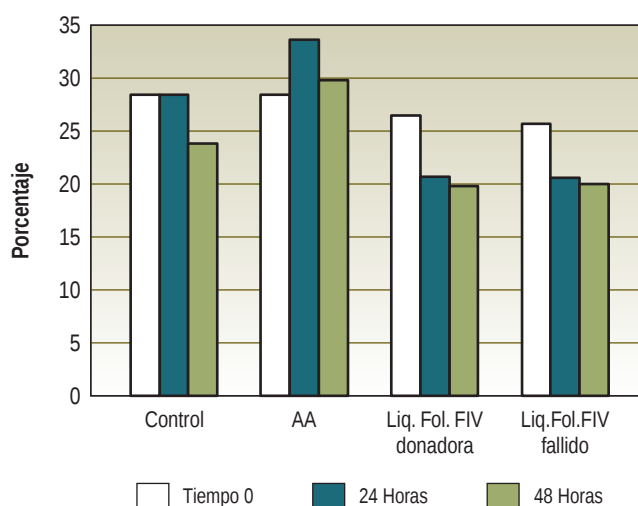


Figura 2. Reacción acrosomal.

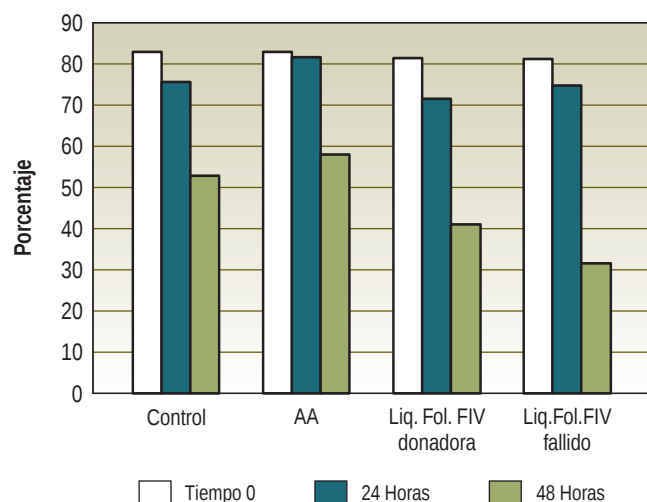


Figura 1. Movilidad espermática.

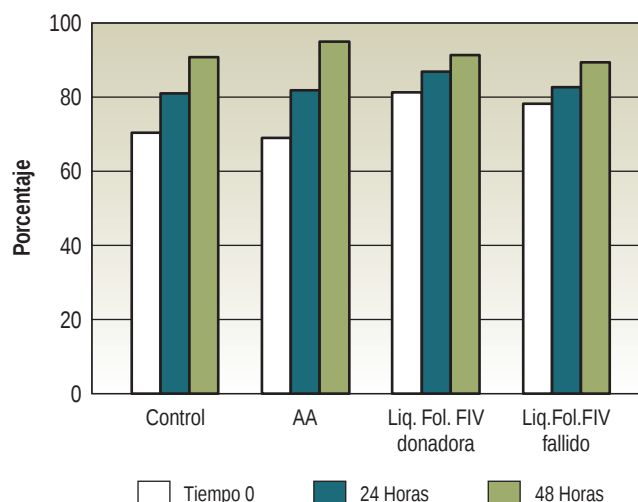


Figura 3. Naranja de acridina positivo.

función espermática —como son la pérdida de la movilidad y disminución de la capacidad del espermatozoide para penetrar al oocito,⁷ así como la extensión del daño por oxidación al ADN— depende del balance entre el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa, presentando una disminución en la capacidad antioxidativa total del plasma seminal de los pacientes infértiles.¹⁶

Para contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo sobre el ADN, el espermatozoide cuenta con dos mecanismos de defensa natural: primero, la cromatina se encuentra altamente condensada en una matriz de protamina y, segundo, el plasma seminal cuenta con capacidad antioxidante. El AA contribuye mayormente en la capacidad antioxidante del plasma seminal.²⁵

Se ha observado una correlación significativa entre los niveles de AA en líquido seminal y la calidad espermática; así pues, el AA en el líquido seminal podría ser utilizado como indicador de la calidad del espermatozoide.²²

En las clínicas de infertilidad es importante determinar qué individuo tiene la capacidad espermática suficiente para fecundar un óvulo a través de un método de fertilización *in vitro* convencional y quiénes requieren de otros métodos de fertilización asistida. Se han desarrollado estudios para determinar la presencia e importancia del AA en el líquido seminal; algunos autores usan el AA para evaluar la calidad y movilidad de los espermatozoides. En nuestro estudio administramos 75, 150, 300 y 600 μ M de AA para determinar el efecto en la movilidad y viabilidad espermática, encontrando que en ausencia del AA $79 \pm 5\%$ de espermatozoides sobreviven 24 horas en el medio de cultivo. A través de ANOVA, se observó incremento en la movilidad y supervivencia espermática cuando se utiliza un suplemento al medio de cultivo de AA ($p < 0.0001$).

Everson y colaboradores³⁶ demostraron que al teñir los espermatozoides con acridina naranja podrían estimar, con base en la muestra obtenida, la fertilidad del individuo. Tejada y asociados introdujeron el concepto de “cuenta de espermatozoides efectivos”, que es el porcentaje del producto de la muestra que tiñe la cabeza de verde, éste es de 50 millones de células/mL, y marca la línea divisoria entre un individuo fértil de un subfértil/infértil.

La morfología del espermatozoide es útil en el estudio inicial de la evaluación del hombre, e identifica también un incremento en el riesgo de anomalías cromosómicas en el espermatozoide. Sin embargo, la morfología espermática anormal por sí sola no necesariamente refleja dichas anomalías. La tinción con fluorescencia verde realizada con acridina naranja intercala monómeros entre las bases paralelas con doble enlace de la hélice de ADN. La fluorescencia con naranja o rojo indica agujeros iónicos entre los

polímeros de acridina naranja y los enlaces sencillos del ADN;²⁶ esto sugiere que la mayoría de los espermatozoides que fertilizan un óvulo *in vivo* y por reproducción asistida son aquellos con núcleo verde fluorescente con tinción de acridina naranja. La tinción de acridina naranja tiene un valor elevado de predicción positiva hacia la fertilización (89%), y bajo valor de predicción negativa (32%). Claseen y su grupo encontraron una correlación moderada positiva entre la prueba de acridina naranja y la morfología espermática.²⁶ Esta relación quizá explique que algunas de las anomalías morfológicas del espermatozoide puedan deberse a una alteración en el ADN.

El incremento en la integridad del ADN en los espermatozoides con acridina naranja positivos en medios de cultivo prolongados (Figura 3, $p < 0.0001$) coincide con lo señalado por Tejada y colaboradores; sin embargo, ni el suplemento con AA ni con líquido folicular en medio cultivo afecta el patrón de cambio con el tiempo en la integridad del ADN.

Hoshi y asociados²⁸ encontraron que, cuando el 50% o más de los espermatozoides en la muestra de espermatozoides mostraban cabeza verde en la tinción de fluorescencia de acridina naranja, la FIV era siempre exitosa; y que cuando la fluorescencia verde con acridina naranja era menor al 50%, sólo el 39% de los ciclos de tratamiento con FIV eran exitosos.²⁸

La tinción de fluorescencia con acridina naranja ayuda a determinar cuáles pacientes deben ser asignados a ICSI sin utilizar técnicas convencionales o técnicas en reproducción asistida.

El acrosoma es una membrana que cubre la cabeza del espermatozoide, la cual aparece durante la espermatogénesis como producto del complejo de Golgi. La reacción acrosomal es un evento crítico fisiológico que permite en las especies mamíferas la interacción entre gametos. La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización *in vivo*; sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con el ovocito para formar un embrión. La reacción acrosomal *in vivo* que permite la fertilización es un evento exocítico muy preciso que envuelve la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. *In vivo*, la reacción acrosomal ocurre después de alteraciones fisiológicas en el gameto llamada capacitación, la cual es inducida por el líquido folicular, albúmina, aminoglicanos y glicoproteínas.²⁹ Esta inducción fisiológica de la reacción acrosomal resulta en un mayor número de espermatozoides con membrana acrosomal reactiva capaces de penetrar en el huevo.

Sólo los espermatozoides que tienen la reacción acrosomal sincronizadas con la fase de penetración del huevo son capaces de fertilizar.³⁰ Altos niveles de re-

acción acrosomal en el espermatozoide son necesarios para tener buenos rangos de fertilización; el nivel de reacción acrosomal en el espermatozoide humano varía entre 1 y 25%.³¹⁻³⁵

La prueba de penetrancia en huevo de hámster simula dos pasos cruciales entre la interacción del huevo y espermatozoide humano: la capacitación espermática, incluyendo reacción acrosomal, y su fusión con la membrana plasmática del huevo. La prueba de penetrancia en huevo de hámster estima la capacidad funcional del espermatozoide.

Se sabe que en el espermatozoide de múltiples pacientes existe una falla en la capacitación y la reacción acrosomal y, por lo tanto, una falla en la penetración de la membrana del óvulo.

El incremento en la reacción acrosomal de los espermatozoides móviles en los cultivos realizados ($p < 0.0001$) coincide con los señalados en estudios previos (Figura 2).

Ninguno de los medios de cultivo AA, ni suplemento con líquido folicular, afectan el patrón de cambio en la reacción acrosomal por unidad de tiempo.

La prueba de penetrancia en huevo de hámster verifica la capacidad (o falla) del espermatozoide para romper y penetrar la membrana del óvulo. Sin embargo, esta prueba no provee información sobre la viabilidad o madurez espermática, ni sobre el potencial del espermatozoide humano para romper y penetrar la zona pelúcida. A pesar de ello, la prueba de penetrancia en huevo de hámster continúa siendo un buen estudio para los pacientes destinados para FIV, ya que la supervivencia espermática es de menor importancia en los procedimientos de reproducción asistida y las anomalías en la estructura acrosomal y/o reactividad que no se diagnostican resultan en falla del rompimiento y penetración de la zona pelúcida durante una FIV; a dichos pacientes se les puede realizar directamente una inyección intracitoplasmática de espermatozoide.

Una prueba de penetrancia en huevo de hámster positiva es predictiva para el éxito de la FIV en un 94%.²⁴

La habilidad con la que el espermatozoide es incorporado dentro del óvulo, y consecuentemente la proporción de óvulos penetrados y el número de pronúcleos por óvulo penetrado, dependen tanto de la calidad del espermatozoide como del óvulo. Actualmente es aceptado que el resultado de la prueba de penetrancia en huevo de hámster refleja la habilidad del espermatozoide de realizar la reacción acrosomal.

En el presente estudio se observó una escasa penetración en los huevos de hámster en 40% del grupo control contra 25% del grupo suplementado con AA.

La prueba de penetrancia en huevo de hámster fue mayor en el 60% de los pacientes del grupo tratado con AA, que en el grupo control. Sólo el 33% de los huevos de hámster fueron penetrados con un porcentaje de 1.6

penetraciones por huevo (mediana de 2 y rango de 0 a 23) en el grupo control; mientras que el grupo tratado con AA fueron penetrados con una mediana de 4 (rango de 0 a 15). Es posible que si nosotros incrementamos el número de pacientes, la diferencia podría ser estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J. The repair ability of oxidative free radical mediated damage to DNA. A review. *Int J Radiat Biol* 1988; 54: 131-150.
2. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K et al. Misleading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327: 77-79.
3. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in Human Sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003-11006.
4. Steenken S. Purine bases, nucleosides and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chem Rev* 1989; 89: 503-20.
5. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1987; 81: 459-469.
6. Barratt CLR, Bolton AE, Cook LD. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod* 1990; 5: 639-644.
7. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 1994; 16: 259-267.
8. Jones R, Mann T, Sherin R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal property of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31: 531-537.
9. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* 1989; 24: 127-134.
10. Zini A, De Lamirande E, 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* 1993; 16: 188-189.
11. Mc Kinney KA, Lewis SEM, Thompson W. Reactive oxygen species generation in human spermatozoa. A comparison of the Luminol and Lucigenin chemiluminescence probes. *Arch Androl* 1995; 36: 119-125.
12. Mbizvo MT, Thomas S, Fulgham DL, Alexander NJ. Serum hormone levels affect sperm function. *Fertil Steril* 1998; 54: 113-120.
13. Lewis SEM, Sterling S, Young I, Thompson W. Comparison of individual antioxidants and total antioxidant capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67: 142-147.
14. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in Human Sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003-6.
15. Lewiss EM, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64 (4): 868-870.

16. Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67 (1): 142-147.
17. Wilson L. Sperm agglutination in human semen and blood *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 85: 652-655.
18. Kupperman HS, Epstein JA. Endocrine therapy of sterility. *Am Pract Dig Treat* 1958; 9: 547-63.
19. Dawson EB, Harris WA, Rankin WE, Charpentier LA, McGanity WJ. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann NY Acad Sci* 1986; 498: 313-323.
20. Thiele JJ, Freisleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic Acid and urate in human seminal plasma; determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reprod* 1995; 10 (1): 110-115.
21. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: The most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264: 155-163.
22. Dawson EB, Harris WA, Teter M, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992; 58 (5): 1034-1039.
23. Tejada R, Cameron M, Norman A, Monk JJ, Friedman A. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1994; 42 (1): 87-91.
24. Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, Lewin A, Rabinowitz R, Joseph G. Correlation between the zona-free hamster egg sperm penetration assay and human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 45 (5): 665-670.
25. Lewis SEM, Sterling S, Young I, Thompson W. Comparison of individual antioxidants and total antioxidant capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67: 142-147.
26. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Proterius E, Swart Y et al. The acridine orange test: Determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7: 242-247.
27. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42 (1): 87-91.
28. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66 (4): 634-639.
29. Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8 (12): 2128-2132.
30. Tesarik J, Mendoza C. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fert Steril* 1993; 60 (1): 141-148.
31. Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8 (12): 2128-2132.
32. Tesarik J. Comparison of acrosome reaction inducing activities of human cumulus oophorous, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* 1985; 74: 383-388.
33. Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986; 14: 107-121.
34. Stock CE, Fraser LR. The acrosome reaction in human spermatozoa from men of proven fertility. *Hum Reprod* 1987; 2: 109-119.
35. Mortimer D, Comenzind AR. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 1989; 4: 169-174.
36. Everson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility *Science* 1980; 210: 1131-1133.