

Andrología

Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad

Sperm DNA fragmentation and implications for fertility

Morales R¹, Lledó B¹, Ortiz José A¹, Rodríguez-Arnedo Dori¹, Fabregat A², Bernabeu R^{3,4}

¹Dpto. Biología Molecular. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante. ²Dpto. Andrología. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante. ³Dpto. Medicina Reproductiva. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante. ⁴Cátedra de Medicina Reproductiva, Universidad Miguel Hernández- Instituto Bernabeu, Alicante.

Resumen

En la actualidad los parámetros obtenidos a través de un seminograma convencional (concentración, movilidad...) no aportan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo. Un estudio exhaustivo del factor masculino requiere determinar algún otro parámetro como es el índice de fragmentación del ADN espermático (DFI).

Se ha demostrado que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN, y que este hecho puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Las muestras de semen que presentan altos niveles de daño en el ADN están con frecuencia asociadas a una disminución de las tasas de fertilización o implantación después de FIV e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y pueden estar asociadas a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto.

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas.

Palabras clave: DFI. Infertilidad masculina.

Summary

The conventional seminal parameters (concentration, motility...) don't give enough information about the potential fertility of semen samples and the ability to obtain a healthy embryo and ongoing pregnancy. For completing study of male factor is necessary analyze other parameters like the DNA Fragmentation Index (DFI).

Correspondencia: Dr. D. Rafael Bernabeu
Avda. Albufereta, 31
03016 Alicante (España)
e-mail: dir@institutobernabeu.com

Infertile men have a higher proportion of spermatozoa with DNA breaks, and this fact possibly result in a negative impact in results of assisted reproduction techniques (ART). Semen samples that contain high levels of DNA damage are often associated with decreased fertilization rates or embryo cleavage after IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and may be linked to bad embryo quality, early embryo death or miscarriage. Several authors have related the values of DNA fragmentation with the results or ART to establish a cut off for predicting the outcome of these techniques.

Key words: DFI. Male infertility.

INTRODUCCIÓN

Se estiman en un 50% los casos de infertilidad atribuibles a una causa masculina, por lo que queda fuera de toda duda que el análisis de las características del semen es esencial en la valoración de la pareja con dificultades reproductivas. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999) estableció unos parámetros básicos que se deben analizar en el estudio del factor masculino de forma rutinaria (volumen de eyaculado, concentración de espermatozoides, motilidad y morfología); aún así, se estima que aproximadamente un 10 o 15% de los varones estériles presentan parámetros dentro de rangos normales. En estos casos el origen de la esterilidad masculina podría deberse, entre otras causas, a defectos en la membrana del espermatozoide (1), factores ambientales (2), o genéticos (3) y por tanto no detectables en el espermograma.

Dado que la transmisión de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al ovocito es esencial para la consecución y desarrollo del embarazo, su rotura podría conllevar alteraciones en la fertilización y desarrollo embrionario consiguiente. Por ello, en los últimos años también se está barajando como causa probable de esterilidad el daño del ADN espermático, y de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino.

ORIGEN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO

La espermatogénesis es el proceso de proliferación y maduración de las células germinales masculinas de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides (4). En cualquier etapa de este proceso se puede producir un daño en el ADN espermático (5).

Sobre la naturaleza de este daño se sabe que es un

fenómeno multifactorial y no del todo delimitado. Se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino como son:

- Generación de radicales libres de oxígeno ó estrés oxidativo (6, 7).
- Empaquetamiento anormal de la cromatina (errores en la sustitución de histonas por protaminas) (8, 9).
- Deficiencias en la recombinación (10).
- Apoptosis tras la salida del espermatozoide a los túbulos.
- Causas externas que pueden provocar o potenciar los efectos anteriores como determinadas condiciones ambientales (contaminación, tabaquismo, temperatura testicular elevada) o patológicas (criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles, estrés).

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO:

Las técnicas que existen para estudiar la fragmentación del ADN espermático se pueden dividir en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos. En este grupo se encuentran las siguientes:

- * SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay (11)
- * DBD-FISH o DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (12)
- * SCD o Sperm Chromatin Dispersion (13)
- * Ensayo cometa (14)

Y en el segundo grupo se incluyen aquellas que marcan las roturas en la cadena de ADN, porque incorporan moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de rotura:

- * TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling (15)
- * ISNT o In Situ Nick Translation (16)

SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay

La SCSA desnatura la molécula de ADN mediante una solución ácida, y una vez desnaturada se tiñe con naranja de acridina. Este fluorocromo se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una longitud de onda de 530 nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN desnaturado) emite una longitud de onda de 640 nm (color rojo). Las células se separan por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturado y por tanto se visualizaría en color rojo.

SCD o Sperm Chromatin Dispersion

Esta técnica consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteinización, de forma que los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión que corresponden a bucles de ADN.

Ensayo cometa

El ensayo cometa se lleva a cabo incluyendo los espermatozoides en un microgel de agarosa situado sobre un portaobjetos, y sometidos a una lisis mediante un agente reductor de grupos sulfidrilos de las protaminas. Los núcleos desproteinizados se someten a electroforesis y se tiñen con sustancias fluorescentes. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico generando una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen.

Túnel

El Túnel consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con un fluorocromo en los extremos 3'-OH de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se lleva a cabo mediante una transferasa terminal (Deoxynucleotidyl Transferase o TdT). La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN.

Esta técnica fue desarrollada para identificar una población apoptótica de espermatozoides en el eyaculado (15). Posteriormente numerosos estudios han

usado la misma técnica (8, 17, 15, 18). Sin embargo, Muratori et al. (19) demostró que la fragmentación del ADN medida mediante TUNEL no estaba siempre asociada con un fenómeno apoptótico en los espermatozoides del eyaculado si no que se debía a una maduración espermática defectuosa por un empaquetamiento incorrecto de la cromatina.

RELACIÓN ENTRE LA FRAGMENTACIÓN Y LA CALIDAD SEMINAL

En humanos, se ha encontrado una estrecha asociación entre parámetros seminales anormales y roturas en el ADN nuclear de los espermatozoides del eyaculado. La fragmentación del material genético del espermatozoide es mayor en pacientes diagnosticados de oligoteratoastenozoospermia (15, 18, 6, 20). Huang et al. (20) evaluaron este fenómeno usando el ensayo TUNEL, apreciando que el DFI (índice de fragmentación del ADN) era significativamente mayor en pacientes con parámetros seminales anormales.

Gandini et al., (21) estudiando la relación entre apoptosis y parámetros seminales, también demostraron que un incremento de la fragmentación estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática y motilidad. Esta correlación se observó también con la morfología. Los gametos que mostraban roturas en su ADN presentaban cabezas pequeñas y amorfas.

Sin embargo los datos obtenidos por Larson-Cook et al. (22) mostraron que el DFI no siempre estaba relacionado con los parámetros seminales. Sólo un 30% de los varones con un DFI superior al 27% presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia.

A pesar de que en la mayoría de los casos la fragmentación se relaciona con anomalías seminales, es muy importante destacar que el 8% de los varones con parámetros seminales normales (esterilidad de origen desconocida) también presentan fragmentación en su ADN.

RELACIÓN ENTRE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y POTENCIAL FERTILIZANTE DEL ESPERMATOZOIDE

Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN (23, 24), y se

ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico sería desfavorable.

En Europa y EEUU se llevaron a cabo de forma independiente dos amplios estudios sobre la relación entre los resultados de la técnica SCSA y la capacidad fertilizante (11, 25). Ambos demostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI) superior al 30-40% es incompatible con la fertilidad in vivo, independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática.

Evenson et al. (26), usando esta técnica establecieron cuatro categorías para el potencial fertilizante del espermatozoide según el DFI:

- excelente si DFI < 15%
- alto si DFI 15-24%
- bajo si DFI 25-30%
- muy bajo si DFI > 30%.

Previamente Aravindan et al. (27) habían establecido una correlación significativa entre las técnicas SCSA, COMET y TUNEL para espermatozoides humanos, por tanto los datos obtenidos mediante una técnica se podrían comparar con los obtenidos por las otras dos. Recientemente Sergerie et al. (24) mediante el TUNEL hallaron prácticamente los mismos puntos de corte que Evenson et al. (26). Para ello midieron la fragmentación del ADN espermático en un grupo de 66 hombres infértiles ($40,9 \pm 14,3$) y 47 hombres fértiles ($13,1 \pm 7,3$), estableciendo un punto de corte del 20%. Chohan et al. (28) llegaron a la misma conclusión comparando un grupo de 60 hombres infértiles con un grupo de 7 donantes mediante tres técnicas (SCSA, TUNEL y SCD).

IMPACTO DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO Y LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

El éxito de las TRA depende de múltiples factores, y entre ellos la integridad estructural y funcional de los gametos usados. Por ello, la naturaleza de la infertilidad y su causa deberían ser analizadas antes de iniciar el tratamiento.

En cuanto al gameto masculino y su material genético se ha demostrado que una fracción elevada de espermatozoides con defectos en la cromatina puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (15, 29, 30, 31). Con frecuencia las muestras de semen que muestran altos niveles de daño en el ADN están asociadas a una disminución de las tasas de fertilización o im-

plantación después de FIV/ICSI, y pueden dar lugar a mala calidad embrionaria, bloqueo embrionario o aborto. Aunque en estos procedimientos se seleccionan los espermatozoides de mejor motilidad y morfología, siempre hay un porcentaje de los mismos que contienen varios grados de daño en el ADN y que pueden alcanzar el ovocito con un mínimo o ningún esfuerzo (FIV o ICSI).

Diversos autores han correlacionado los valores de fragmentación con los resultados de las TRA para intentar establecer un punto de corte a partir del cual se pueda predecir el resultado de las mismas. Lograrlo supondría aumentar notablemente las tasas de éxito, reducir el número de ciclos innecesarios y conseguir finalmente una eficiencia mayor de la técnica de reproducción asistida empleada lo que redundaría no sólo en mayores tasas de embarazo sino también en menor coste socio-económico.

Relación entre fragmentación del ADN espermático y tasa de fertilización

En cuanto a la relación que existe entre el DFI y la tasa de fertilización en TRA los resultados son controvertidos. Larson-Cook et al. (22), Sakkas et al. (32) y Morris et al. (33) observaron que ambos parámetros no estaban relacionados. Sin embargo otros autores como Sun et al. (17), Lopes et al. (15) y Saleh et al. (34) demostraron una correlación negativa entre fragmentación del DNA y tasa de fertilización tras FIV/ICSI. Un nivel de daño elevado en el DNA estaba asociado con una baja tasa de fertilización. Virro et al. (35) determinaron la relación entre los resultados de SCSA y los resultados de FIV/ICSI. Las tasas de fertilización con FIV/ICSI no fueron estadísticamente significativas entre grupos con alto y bajo DFI. Henkel et al. (36) usando la técnica TUNEL tampoco encontraron correlación entre el DFI y la tasa de fertilización en ciclos de FIV/ICSI.

Relación entre fragmentación del ADN espermático y desarrollo embrionario.

Las primeras etapas del desarrollo embrionario están sometidas al control materno y la expresión de los genes paternos comienza en el estadio de 4-8 células; en ese momento las alteraciones del ADN paterno se ponen de manifiesto, perjudicando el desarrollo del embrión y produciendo bloqueo embrionario, que puede explicar ciertos fallos de implantación, embarazos bioquímicos o abortos clínicos (37).

El efecto paterno a veces es aparente ya en el estadio embrionario de pronúcleos (efecto paterno tem-

prano), y se ha sugerido que puede deberse a una deficiencia de factores activadores del ovocito (38), o a un elevado nivel de fragmentación que pueda exceder la capacidad reparadora del mismo (39). Pero la implicación de la fragmentación del ADN espermático en este estadio todavía es un tema controvertido.

Tras observar un efecto negativo de una elevada fragmentación en los resultados de las TRA (40, 29, 33, 41), se ha sugerido que el daño en el ADN del gameto masculino podría considerarse un marcador para el estudio de la implicación paterna en el desarrollo preimplantacional en humanos. Así Tesarik et al. (42) demostraron que un alto nivel de fragmentación del ADN espermático normalmente no se asocia con anomalías morfológicas en los estadios embrionarios iniciales pero afecta a la tasa de implantación (efecto paterno tardío). Estos autores proponen que un análisis de la fragmentación del ADN espermático mediante TUNEL (tras capacitación por swim up) es un buen método diagnóstico para revelar la causa paterna de los repetidos fallos de implantación en ICSI con embriones de buena calidad morfológica.

Relación entre fragmentación del ADN espermático y tasa de embarazo

Respecto a la fragmentación del ADN espermático y tasa de embarazo, los resultados son bastante controvertidos. Con la técnica SCSA Larson et al. (29), Larson-Cook et al. (22) y Saleh et al. (34) no obtuvieron ningún embarazo tras FIV/ICSI con un DFI en semen fresco superior al 27%. De acuerdo con estos resultados Virro et al. (35) observaron que un DFI en semen fresco por encima del 30% se correspondía con una baja tasa de formación de blastocistos y de embarazo. Sin embargo Bungum et al. (43) y Payne et al. (44) sí consiguieron embarazo tras FIV/ICSI con una DFI > 27%.

Bungum et al. (43) compararon las tasas de embarazo, tanto en ciclos de IAC como en ciclos de FIV/ICSI, entre el grupo de varones que presentaba una fragmentación inferior al 27% y el grupo en que dicha fragmentación era superior a este valor. Observaron que en ciclos de IAC las tasas de embarazo clínico y de niño nacido eran cuatro veces inferiores en los varones con DFI por encima del 27%; sin embargo en ciclos de FIV/ICSI estas tasas prácticamente no variaban. Desglosando los resultados de FIV e ICSI sí observaron una diferencia entre ambas técnicas, ya que en FIV la tasa de embarazo era la mitad que en ICSI cuando el DFI superaba el valor umbral. Esta diferencia la atribuyeron a que en ICSI el observador selecciona el espermatozoide de mejor

motilidad y morfología y por tanto con mucha probabilidad el de menor nivel de fragmentación.

Host et al. (40) obtuvieron resultados similares a los anteriores usando la técnica TUNEL. Mediante esta técnica se han llevado a cabo bastantes estudios posteriores. En un trabajo realizado por Duran et al. (45) en IAC ninguna muestra con DFI superior al 12% dio lugar a embarazo. Benchaib et al. (41) tras llevar a cabo 54 ciclos de ICSI tampoco obtuvo ningún embarazo cuando la fragmentación era mayor del 20%. Sin embargo Seli et al. (37) y Huang et al. (20) no apreciaron una relación entre la tasa de embarazo y la tasa de fragmentación del ADN espermático.

También mediante TUNEL Borini et al. (46) compararon dos grupos de varones con alta y baja tasa de fragmentación (TUNEL > 10% y TUNEL < 10% tras capacitación por swim-up) observando que además de una alta correlación negativa entre fragmentación del ADN espermático y parámetros seminales (concentración, motilidad y morfología), se daba una relación significativa entre fragmentación del ADN y desarrollo embrionario post-implantación en ICSI. La tasa de embarazo clínico y la tasa de aborto eran significativamente diferentes entre pacientes con alta y baja fragmentación espermática en los casos de ICSI, por tanto un elevado daño en el ADN del espermatozoide puede comprometer la viabilidad embrionaria y producir embarazo bioquímico o aborto. En FIV no encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo entre pacientes con TUNEL alterado y pacientes con TUNEL normal. Esta ausencia de diferencias la atribuyen a que durante el FIV se produce una selección espermática "natural".

Bechaib et al. (47) también compararon los resultados obtenidos en FIV e ICSI en dos grupos con fragmentación inferior y superior al 15% (tras capacitación por gradientes) y observaron, al igual que los autores anteriores, que alteraciones en los parámetros seminales se relacionaban con un DFI elevado con porcentaje de aborto significativamente superior en el grupo cuya fragmentación está por encima del 15%.

Otros autores (48) realizaron análisis de fragmentación del ADN espermático (TUNEL) en pacientes con abortos recurrentes, mostrando que muchos de estos tenían un nivel elevado de fragmentación.

Con un DFI de 20-40% se supone que más de la mitad de los espermatozoides están intactos, pero sin embargo no dan lugar a un desarrollo embrionario normal según la mayoría de los datos obtenidos hasta ahora. Este hecho podría deberse a dos razones:

- * En primer lugar, es posible que el daño en el ADN detectable sólo represente la punta del iceberg y que exista un daño oculto en la mayoría

de los espermatozoides que dan negativo en las técnicas usadas para medir fragmentación.

* Y en segundo lugar puede ocurrir que la fragmentación del ADN espermático esté asociada con anomalías cromosómicas (aneuploidías). Muriel et al. (49) observaron que la tasa de aneuploidías era $4,6 \pm 2,0$ mayor en espermatozoides con roturas en el ADN. La aneuploidía durante la maduración espermática puede dar lugar a una fragmentación del ADN como un mecanismo desarrollado para inactivar el espermatozoide genéticamente defectuoso, o bien porque durante la recombinación genética la existencia de roturas en el ADN da lugar a aneuploidías.

RELACIÓN ENTRE EL DFI Y LA EDAD DEL VARÓN

Se conoce mucho sobre la disminución de la fertilidad con la edad de la mujer pero sin embargo todavía se está estudiando si la edad paterna afecta a la fertilidad en el mismo grado. Varios estudios han demostrado que no existe correlación entre edad del varón y tasas de embarazo después de TRA (5-7). Sin embargo, otros han demostrado lo contrario (9, 11).

La calidad del semen es la principal medida de la fertilidad del varón. Existen trabajos que defienden una disminución de los parámetros seminales convencionales con la edad (50-57). Recientemente, se está usando la fragmentación del ADN espermático como marcador de fertilidad masculina y también se está investigando su relación con la edad del varón. Morris et al. (33), Singh et al. (58), Trisini et al. (59) observaron usando la técnica del cometa que la fragmentación aumentaba con la edad, sin embargo Benchaib et al. (41) no vieron correlación entre ambos parámetros mediante la técnica TUNEL.

Moskovtsev et al. (60) recientemente mediante SCSA analizaron la fragmentación junto con otros parámetros seminales en grupos de varones de diferentes edades. Cuando las muestras del grupo de varones mayores de 45 años se compararon con aquellas de otros grupos se observó una diferencia significativa en tres parámetros: motilidad, vitalidad, y DFI. Los varones de 45 años o mayores presentaban menor motilidad espermática que los varones más jóvenes, mientras que el DFI era significativamente mayor. El DFI en el grupo de mayor edad era superior al 30%, lo cual se corresponde con un bajo potencial fertilizante, sin embargo en los grupos de

varones más jóvenes el DFI estaba por debajo de ese valor (del 15% al 30%).

REDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO CON ANTIOXIDANTES ORALES

Estudios previos han sugerido la implicación del estrés oxidativo en la etiología de las roturas del ADN espermático. Por ello se cree que el tratamiento con antioxidantes puede disminuir este daño. Se ha estandarizado un tratamiento por vía oral consistente en la administración diaria de 1g de vitamina C y 1g de vitamina E durante dos meses porque existen estudios que demuestran una reducción significativa de la fragmentación del ADN espermático tras dicho tratamiento.

En el estudio de Greco et al. (61) la fragmentación disminuyó notablemente del 22% al 9% en un grupo de 64 pacientes tras la administración del tratamiento anterior. Aunque no se observaron mejoras significativas de la concentración, motilidad y morfología espermática, si se demostró el efecto protector de los antioxidantes en la integridad del ADN espermático.

En un estudio llevado a cabo por los mismos autores en 38 pacientes con DFI (TUNEL) superior al 15% y dos o más ciclos ICSI sin embarazo, se demostró un descenso del DFI en el 76% de los casos después del tratamiento antioxidante. Al realizar un nuevo ciclo ICSI después de dicho tratamiento no se obtuvieron diferencias en tasas de fertilización ni en morfología embrionaria respecto a los ciclos anteriores pero si en tasas de implantación y de embarazo clínico.

REDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN ESPERMATOZOIDES DEL TESTÍCULO

Algunos estudios han sugerido que el daño en el ADN espermático puede ocurrir a nivel post-testicular. Greco et al. (62) realizaron un trabajo para demostrar la ventaja de usar espermatozoides de testículo en estos casos. El porcentaje de fragmentación fue significativamente inferior en espermatozoides testiculares en comparación con espermatozoides del eyaculado. No se observaron diferencias en tasas de fertilización e implantación ni en morfología embrionaria entre los ciclos ICSI realizados con espermatozoides

del eyaculado o del testículo. Sin embargo, con espermatozoides testiculares se obtuvieron ocho embarazos clínicos mientras que con espermatozoides del eyaculado sólo se logró un embarazo que finalizó en aborto espontáneo. Estos datos demostraron que un ciclo ICSI con espermatozoides testiculares es una opción eficaz para varones con alto nivel de fragmentación en el ADN espermático, de causa posttesticular.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Rajeev SK, Reddy KV.:** Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod.*, 2004;19: 234-242.
2. **Sinawat S.:** The environmental impact on male fertility. *J Med Assoc Thai.* 2000; 83:880-885.
3. **Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, Matsumiya K, Okuyama A.:** Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol.* 2001; 8: 49-52.
4. **de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N.:** Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1-8.
5. **Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A.:** Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 2006; 8: 11-29.
6. **Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT.:** Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001; 75: 674-7.
7. **Aitken RJ, Krausz C.:** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122: 497-506.
8. **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D.:** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52: 864-7.
9. **Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.:** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999; 4: 31-7.
10. **Agarwal A, Allamaneni SS.:** The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol.* 2004; 56: 235-45.
11. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP.:** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999; 14: 1039-49.
12. **Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J.:** DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 2000; 20; 453: 77-82.
13. **Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG.:** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003; 24: 59-66.
14. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.:** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175: 184-91.
15. **Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.:** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998; 13: 896-900.
16. **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z.:** Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993; 207: 202-5.
17. **Sun JG, Jurisicova A, Casper RF.:** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997; 56: 602-7.
18. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.:** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.
19. **Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M.:** Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 2000; 21: 903-12.
20. **Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS.:** Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2005; 84: 130-40.
21. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.:** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15: 830-9.
22. **Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kaspersen KM, Aamold ET, Evenson DP.:** Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003; 80: 895-902.
23. **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.* 2002; 78: 313-8.

24. **Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G.:** Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005; 20: 3446-51.
25. **Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G.:** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 2000; 73: 43-50.
26. **Evenson DP, Larson KL, Jost LK.:** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002; 23: 25-43.
27. **Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP.:** Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1997; 236: 231-7.
28. **Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT.:** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006; 27: 53-9.
29. **Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP.:** Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1717-22.
30. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D.:** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66: 1061-7.
31. **Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E.:** Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 2003; 24: 253-62.
32. **Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A.:** Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996 ; 11: 837-43.
33. **Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR.:** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002; 17: 990-8.
34. **Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ.:** Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003; 79: 1597-605.
35. **Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP.:** Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004; 81: 1289-95.
36. **Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF.:** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 2004; 81: 965-72.
37. **Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D.:** Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004; 82: 378-83.
38. **Tesarik J, Mendoza C, Greco E.:** Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* 2002; 17: 184-9.
39. **Braude P, Bolton V, Moore S.:** Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988; 332: 459-61.
40. **Høst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S.:** The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000; 79: 559-63.
41. **Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF.:** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1023-8.
42. **Tesarik J, Greco E, Mendoza C.:** Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004; 19: 611-5.
43. **Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A.:** The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1401-8.
44. **Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK.:** Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005; 84: 356-64.
45. **Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S.:** Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2002;17: 3122-8.
46. **Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G.:** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2876-81.
47. **Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J.:** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* 2007; 87: 93-100.

48. **Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B.:** Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003; 49: 49-55.
49. **Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL.:** Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl.* 2007; 28: 38-49.
50. **Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF.:** Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *Andrologia.* 1982; 14: 164-70.
51. **Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH.:** Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996; 65: 1009-14.
52. **Dondero F, Mazzilli F, Giovenco P, Lenzi A, Cerasaro M.:** Fertility in elderly men. *J Endocrinol Invest.* 1985; 8: 87-91.
53. **Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P.:** Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995; 332: 281-5.
54. **Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, David G.:** Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril.* 1983; 39: 530-5.
55. **Henkel R, Bittner J, Weber R, Hüther F, Miska W.:** Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril.* 1999; 71: 1138-43.
56. **Rolf C, Behre HM, Nieschlag E.:** Reproductive parameters of older compared to younger men of infertile couples. *Int J Androl.* 1996; 19: 135-42.
57. **Andolz P, Bielsa MA, Vila J.:** Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod.* 1999; 14: 731-5.
58. **Singh NP, Muller CH, Berger RE.:** Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1420-30.
59. **Trisini AT, Singh NP, Duty SM, Hauser R.:** Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril.* 2004; 82: 1623-32.
60. **Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB.:** Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril.* 2006; 85: 496-9.
61. **Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J.:** Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005; 26: 349-53.
62. **Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J.:** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005; 20: 226-30.