



Fragmentación del ADN espermático: situación actual

Saucedo-de la Llata E,¹ López-Reyes JJ,² Moraga-Sánchez MR,³ Romeu-Sarrió A,⁴ Carmona-Ruiz IO⁵

Resumen

OBJETIVO: revisar los mecanismos responsables de la fragmentación del ADN espermático y sus métodos de análisis, la definición de fragmentación del ADN y las características que hacen al espermatozoide único y diferente de las demás células. Discutir la trascendencia de las técnicas actuales para evaluar la fragmentación del ADN espermático, su utilidad y aplicación clínica. Emitir recomendaciones de práctica clínica según lo que el grupo considera el mejor abordaje en este tema.

METODOLOGÍA: búsqueda bibliográfica en las bases de datos: Medline, Pubmed, Pubmed Central y Google Scholar con las palabras clave: fragmentación del ADN, fragmentación del ADN espermático, fragmentación del ADN espermático humano y pruebas de fragmentación del ADN.

RESULTADOS: se seleccionaron 143 artículos con adecuada metodología, claridad y relevancia clínica y se encontraron 16 metanálisis, de los que se seleccionaron 5 por su metodología y claridad en los resultados.

CONCLUSIÓN: la integridad del genoma paterno es decisiva para conseguir un recién nacido sano. Las técnicas actuales están lejos de la perfección en términos de predictibilidad, selección y resultados. Sin embargo, las nuevas tecnologías pueden aportar información faltante para dilucidar el papel de las pruebas de fragmentación del ADN espermático en el laboratorio de reproducción asistida.

PALABRAS CLAVE: fragmentación del ADN, fragmentación ADN espermática, pruebas de fragmentación espermática

Ginecol Obstet Mex. 2017 March;85(3):164-189.

Sperm DNA fragmentation: Current research

Saucedo-de la Llata E,¹ López-Reyes JJ,² Moraga-Sánchez MR,³ Romeu-Sarrió A,⁴ Carmona-Ruiz IO⁵

Abstract

OBJECTIVE: To review the mechanisms responsible for sperm DNA fragmentation and its methods of analysis. This includes a briefly review about the definition of DNA fragmentation; what characteristics make the sperm unique and different from other cells. We also give

¹ Director médico.

² Director del laboratorio de fertilización in vitro.

³ Codirectora.

⁴ Coordinador clínico.

⁵ Coordinador científico.

Clínica Imar, Murcia, España

Recibido: abril 2016

Aceptado: mayo 2016

Correspondencia

Dr. Israel Obed Carmona-Ruiz
israel.carmona@clinicaimar.com

Este artículo debe citarse como

Saucedo-de la Llata E, López-Reyes JJ, Moraga-Sánchez MR, Romeu-Sarrió A, Carmona-Ruiz IO. Fragmentación del ADN espermático: situación actual. Ginecol Obstet Mex 2017 mar;85(3):164-189.



a discussion about the impact of the current techniques to evaluate sperm DNA fragmentation and its utility and clinical application. Lastly, there are practice recommendations regarding what our group considers to be the best approach for this subject.

METHODOLOGY: Bibliographic search in the databases: Medline, Pubmed, Pubmed Central and Google Scholar with the keywords: DNA fragmentation, sperm DNA fragmentation, fragmentation of human sperm DNA and DNA fragmentation tests.

CONCLUSION: The integrity of the paternal genome is of crucial importance to reach our goal of a healthy newborn. Current techniques are far from perfect in terms of predictability, selection and results. New technologies may give us the information missing in order to elucidate the role of sperm DNA fragmentation tests in the assisted reproduction lab.

KEY WORDS: DNA fragmentation; Sperm DNA fragmentation; Human sperm fragmentation; DNA fragmentation tests

¹Director médico.

²Director del laboratorio de fertilización in vitro.

³Codirectora.

⁴Coordinador clínico.

⁵Coordinador científico.

Clínica Imar, Murcia, España

Correspondence

Dr. Israel Obed Carmona-Ruiz

israel.carmona@clinicaimar.com

ANTECEDENTES

En la bibliografía clásica se establece que alrededor del 40% de las causas de infertilidad son atribuibles al factor masculino.^{1,2} A pesar de esto, el análisis convencional del semen permanece como la única prueba de rutina para diagnosticar problemas en el varón.

La integridad genética del gameto masculino es decisiva para un embarazo sano y exitoso.³ La bibliografía sugiere que la alta fragmentación del ADN espermático es un marcador de calidad y posible predictor de fertilidad.^{4,5}

En su edición más reciente, el manual de la Organización Mundial de la Salud para la evaluación del factor masculino (quinta edición), ajusta los parámetros de tal modo que se tienen menos varones clasificados como infértils.⁶ Esto representa un problema debido a que el análisis convencional del semen puede mostrar valores normales cuando hay altos niveles de fragmentación del ADN espermático⁷⁻⁹ y que, como tal,

tiene un valor predictivo bajo para la evaluación en fertilidad y función espermática.¹⁰

Aunque un espermatozoide con daño en el ADN puede fertilizar un ovocito,^{11,12} una pregunta ha despertado gran interés: ¿qué pasa con los ovocitos que no pueden reparar al ADN espermático? Nuestros conocimientos aún son limitados y gran parte de las observaciones se basan en suposiciones acerca del complejo mecanismo de la fertilización, implantación, desarrollo y nacimiento de un niño sano.

El papel de la fragmentación del ADN espermático es, por lo tanto, motivo de controversia; por esto, el propósito de esta revisión es: definir dónde nos encontramos para poder partir hacia la utilidad de las pruebas de fragmentación del ADN espermático.

METODOLOGÍA

La búsqueda bibliográfica se efectuó en las bases de datos: Medline, Pubmed, Pubmed Central y

Google Scholar, con las palabras clave: *DNA fragmentation, sperm DNA fragmentation, human sperm fragmentation y sperm DNA fragmentation tests*. No hubo restricción por fecha debido a la importancia de conocer el desarrollo y la evolución de los conceptos y las pruebas que se han utilizado en la clínica. Se realizan filtros de la búsqueda con base en ensayos clínicos controlados, revisiones y metanálisis. *Criterios de selección:* artículos escritos en español o inglés; consistencia y metodología adecuadas en el caso de ensayos clínicos y en los metanálisis; y aplicación de los estudios o pruebas en humanos. Se dio preferencia a los estudios que aportaron información acerca de la repercusión de las técnicas actuales para evaluar la fragmentación del ADN espermático humano, su utilidad y aplicaciones clínicas.

Se incluyó, además, una breve revisión de la definición del concepto “fragmentación del ADN” y de las características que hacen al espermatozoide único y diferente de las demás células. Por último se hace una serie de recomendaciones de práctica clínica con base en lo que nuestro grupo considera el mejor abordaje en este tema.

RESULTADOS

Las palabras clave más generales, como: fragmentación del ADN y fragmentación del ADN espermático, resultaron en más de 20,000 y 1,600 artículos, respectivamente. Se llevó a cabo una exhaustiva selección con base en los criterios señalados y, sobre todo, la aplicación en humanos. La muestra se redujo a 409 artículos, de los que se seleccionaron 143 con adecuada metodología o relevancia clínica. Se encontraron 16 metanálisis y de éstos se seleccionaron 5 por su metodología y claridad en los resultados.

Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN se ha descrito desde trabajos como el de Hans Ris y Mirsky (1949),

quienes mencionan que la estructura de los cromosomas cambia por eventos espontáneos o en condiciones experimentales (rayos X, etc.) que causan roturas (fragmentación) de los mismos.¹³

Este grupo, aísla cromosomas del núcleo en reposo de tejidos de mamíferos describiéndolos como cuerpos de tamaño y forma característica, visiblemente dobles con regiones en espiral y otras sin ellas.¹³ Su trabajo consistía principalmente en explicar el estado físico o visible de los cromosomas, ya que en esa época el concepto de que los cromosomas pasaban por diferentes cambios dependiendo del ciclo celular estaba sin definir. A través de fotografías ultravioleta de células intactas y teñidas con tinción de Feulgen se observó una distribución par del ADN en el núcleo. Dependiendo del estado del ADN altamente polimerizado, cada cromosoma existe ya sea en un estado extendido o condensado. Durante la mitosis, los cromosomas se enrollan y toma lugar una condensación parcial del ADN, por lo tanto, son visibles en las células en división.¹³ Concluyen que la capacidad de condensación de los cromosomas depende de su contenido en ADN, ya que si éste ha sido removido, el cromosoma pierde su propiedad reversible de extensión y condensación.¹³

El concepto estricto de Fragmentación del ADN fue introducido en 1970, cuando Williamson¹⁴ aisló ADN de hepatocitos de embrión de ratón. El ADN aislado presentaba diferentes grados de absorción para una marca determinada y esta diferencia es común entre el ADN del citoplasma y el ADN nuclear. Por lo tanto, formuló la hipótesis de que los fragmentos de ADN citoplasmáticos correspondían a una degradación específica de ADN nuclear asociada a muerte celular o apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular involucrado en inflamación, diferenciación celular y proliferación.¹⁵ Se caracteriza por cam-



bios morfológicos y bioquímicos que incluyen ensanchamiento de la membrana plasmática, exposición de fosfatidilserina, condensación nuclear y fragmentación del ADN.¹⁶

Durante la apoptosis, las roturas del ADN ocurren en dos etapas: la primera es el clivaje en los dominios de asa de la cromatina para generar fragmentos de ADN de masa molecular relativamente alta; la segunda etapa es el clivaje de esas partes “sueltas” del ADN internucleosomal en fragmentos de ADN de masa molecular pequeña.¹⁷

Las caspasas son mediadores clave de la fragmentación del ADN. Activan casi todas las vías de apoptosis a través de un amplio rango de proteínas nucleares y citoplasmáticas.¹⁸ No obstante, la ausencia o el inactivar las caspasas no previene la fragmentación de ADN.^{19,20} Se han descrito diversas nucleasas como responsables en la degradación del ADN durante la apoptosis, dos de las principales son la endonucleasa G (EndoG) y el factor de fragmentación del ADN (DFF).¹⁵

Cada nucleasa tiene una localización distinta, se regulan por diferentes vías y generan fragmentación del ADN por distintos caminos. Por ejemplo la translocación de la EndoG de la mitocondria al núcleo conduce a fragmentación del ADN,²¹ mientras que la activación nuclear del DFF lleva a una fragmentación del ADN oligonucleosomal característica.²²

Para el proceso de activación de la muerte celular por las caspasas, la fosforilación reversible de las proteínas desarrolla un papel importante. Diversas cinasas y fosfatasas participan en el control de supervivencia o muerte celular, por lo que sus inhibidores son utilizados comúnmente como inductores de apoptosis o inhibidores de ésta. Determinar la relación que existe entre las proteínas y la fosforilación ayudaría a comprender cómo se regula la apoptosis.

Fragmentación del ADN espermático

El conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas, forma las estructuras de alto orden llamadas cromatina.²³ Su unidad básica es el nucleosoma, que consiste en alrededor de 146 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un octámero de histona.^{23,24} La estructura de la cromatina se modifica por distintos mecanismos y es un factor regulatorio para diversos procesos biológicos que incluyen la replicación del ADN, su reparación, división celular y transcripción.^{25,26,27}

La cromatina del espermatozoide difiere de la correspondiente a las células somáticas en sus constituyentes y arreglo.²⁸ Durante la espermogénesis las protaminas (casi la mitad de tamaño que una histona) reemplazan la mayoría de las histonas y la cromatina cambia a una estructura “superenrollada” denominada toroides.²⁹ Una vez que el espermatozoide pasa a través del epidídimo las protaminas se unen por enlaces disulfido reduciendo la cromatina a una sexta parte del volumen de una célula somática.³⁰ Esta densa compactación da protección contra el daño exógeno del ADN espermático.^{11,31} El “alto” condensamiento y su naturaleza insoluble, juegan un papel protector durante el paso de los espermatozoides a través de los conductos reproductivos masculino y femenino.^{32,33} A pesar de esta protección los niveles basales de daño sobre el ADN espermático son relativamente altos en el varón cuando se comparan con otras especies³⁴ y además, los espermatozoides de varones infériles son más susceptibles al daño con el tiempo después de la eyaculación.³⁵

La fragmentación del ADN espermático se define como roturas del ADN espermático de cadena sencilla o doble³⁶ y se dice que es una de las causas de subfertilidad en el varón.

El ADN espermático se vuelve susceptible al daño si el empaquetamiento de la cromatina no

se completa durante la espermatogénesis cuando ocurre el reemplazo por protamina.²⁸ Este reemplazo, en el proceso de remodelación de la cromatina, se facilita por nudos temporales ligados a actividad de topoisomerasa,³⁷ si los nudos no se corrigen, evolucionan a ADN fragmentado en espermatozoides maduros.²⁸ También puede haber daño inducido por radicales libres de oxígeno presentes durante la espermatogénesis.³⁴

El daño de cadena doble del ADN está relacionado con apoptosis, hidrólisis por caspasas y endonucleasas, y por radicales libres de oxígeno, haciéndolo más difícil de reparar que el de cadena sencilla.³⁴

Se cree que las anomalías en los paquetes de cromatina del espermatozoide humano se deben a defectos en los mecanismos de condensación nuclear como la falta de depósito de protamina durante la espermatogénesis.^{38,39} Estas anomalías pueden asociarse con una incrementada inestabilidad del ADN y la sensibilidad a la desnaturalización. Griveau y colaboradores,⁴⁰ también observaron que los hombres con astenozoospermia presentan un alto porcentaje de espermatozoides con núcleos anormales y una lenta e incompleta descondensación de la cromatina.

El daño al ADN del espermatozoide puede afectar tanto al ADN mitocondrial como al nuclear y básicamente puede ser inducido por 6 mecanismos principales, definidos ampliamente por Sakkas y Álvarez.³⁴ Estos pueden ocurrir durante la producción o el transporte de los espermatozoides e incluyen:

i. **Apoptosis durante la espermatogénesis.**

Durante el proceso de espermatogénesis, la célula germinal muestra un mecanismo de tamizaje controlado por las células de Sertoli, que inducen la apoptosis en el 50 a 60% de todas las células que alcanzan la

meiosis I. Estas células son seleccionadas a través de marcadores apoptóticos del tipo Fas y son fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli a que estén asociadas.^{41,42,43} Este mecanismo no siempre funciona eficientemente y un porcentaje variable de estas células germinales defectuosas entra al proceso de espermogénesis apareciendo posteriormente en el eyaculado. Un estudio de Burrello y su grupo⁴⁴ sugiere que hay una disociación entre la calidad del genoma de la célula germinal y el espermatozoide resultante. Esto significa que las células germinales que tengan el núcleo dañado por la apoptosis, pueden formar espermatozoides morfológicamente normales.

ii. **Roturas de la cadena del ADN durante el remodelado de la cromatina en la espermatogénesis.** Dos autores, McPherson y Longo,^{45,46} propusieron que los nudos en el ADN de espermatozoides del eyaculado pueden ser indicio de una incompleta maduración durante la espermatogénesis. Afirman que el empaquetamiento de la cromatina puede requerir actividad endógena de nucleasa para crear y ligar los nudos que facilitan la protaminación. Estos nudos proveen de un “descanso” al estrés de la torsión de la cadena durante el desplazamiento de histonas por protaminas.⁴⁷ Alteraciones que en el control de este proceso, culminan con anomalías del empaquetamiento de la cromatina o nudos de ADN no reparados.

iii. **Fragmentación post-testicular del ADN inducida por radicales de oxígeno durante el transporte a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo.** El espermatozoide inmaduro produce gran cantidad de radicales libres de oxígeno (ROS) que pueden dañar el ADN del esperma maduro. Ambos espermatozoides conviven durante



su transporte de los túbulos seminíferos hacia la cauda del epidídimo.⁴⁸ A pesar de que la vida media de los ROS es de nanosegundos a microsegundos, el alto empaquetamiento para el almacenaje en el epidídimo facilita el daño por ROS. Este daño puede ser directo o a través de la activación de caspasas y endonucleasas. En general, el grado de fragmentación del ADN espermático es mayor en el eyaculado que en el esperma testicular^{49,50} y en el cuerpo y cauda del epidídimo. La inducción de fragmentación del ADN espermático del epidídimo puede estar relacionada con la calidad del genoma. Esto sería un mecanismo más por el que la célula de Sertoli elimina espermatozoides dañados genómicamente.⁵¹

iv. Fragmentación del ADN por caspasas y endonucleasas. La activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas por los ROS y otros factores fisicoquímicos induce fragmentación del ADN espermático. Estudios en ratones muestran cómo la exposición a temperaturas superiores a 40°C induce fragmentación del ADN espermático, incluso dentro de la primera hora de exposición al calor.^{52,53} Puesto que el núcleo de los espermatozoides del ratón está empaquetado de manera más homogénea que en el hombre, es factible pensar que éste es más susceptible al calor debido a las bajas concentraciones de protamina en el núcleo y la mayor heterogeneidad del empaquetamiento nuclear.⁵⁴

v. Daño al ADN por radioterapia y quimioterapia. El efecto citotóxico de la quimioterapia o radioterapia sobre el epitelio espermatogénico se cree que es el causante de la reducción de esperma y la consiguiente infertilidad masculina.⁵⁵ Los estudios específicos sobre este tema son limitados. O'Flaherty y

su grupo⁵⁶ observaron que la integridad y compactación espermáticas se veían afectadas en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin aún antes de la quimioterapia.

vi. Daño inducido por tóxicos ambientales. Estudios previos muestran la evidencia de una asociación entre la exposición a las altas concentraciones de contaminantes aéreos y el incremento del daño al ADN espermático. En un trabajo de Rubes y sus coautores⁵⁷ se plantea la hipótesis de que los hombres que son homocigotos para la glutatión-S-transferasa M1 tienen menor capacidad de eliminar metabolitos reactivos de hidrocarbonos aromáticos policíclicos carcinogénicos encontrados en el aire. Por lo tanto, estos varones serían más susceptibles a los efectos dañinos sobre la cromatina espermática.

Conviene señalar que los procesos de conservación de espermatozoides (criopreservación y descongelación) inducen fragmentación del ADN espermático, independientemente de las características de la muestra en fresco.⁵⁸ Ha sido afirmado que este efecto se debe, fundamentalmente, a estrés oxidativo.⁵⁹ No obstante, otros autores no han confirmado este hecho de la criopreservación.⁶⁰

Reparación del ADN espermático

Hay tres caminos diferentes para las células que experimentan daño en el ADN:²⁸

1. Activar la vía apoptótica, lo que conduce a muerte celular.
2. Tolerar la lesión, que puede llevar a mutaciones para la siguiente generación.
3. Reparar la lesión, mediante la activación de mecanismos de reparación en las cé-

lulas germinales de mamíferos, como por ejemplo: a) reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER), reparación no idéntica (MMR), reparación post-replicación (PRR) y reparación de rotura de doble cadena de ADN (DSBR).

La espermatogénesis consiste en tres fases resumidas: 1) la espermatogonia pasa por una serie de divisiones mitóticas y se diferencia en espermatocitos primarios; 2) los espermatocitos llevan a cabo la recombinación meiótica dando origen a espermátides haploides; y 3) la espermiogénesis involucra el rearreglo de la estructura del citoesqueleto y transformación de las espermátides redondas a espermatozoides maduros. Por lo tanto, la maduración de las células germinales comprende una reorganización genómica y un proceso extraordinario de remodelaje para generar gametos haploides.⁶¹

Durante la espermiogénesis, la transición de histona a protamina en la cromatina espermática produce roturas de las cadenas de ADN.^{47,62} Estas roturas fisiológicas permiten cambios topológicos asociados con la relajación del ADN durante el intercambio de nucleoproteínas y se le atribuye a la actividad de topoisomerasa beta II (TOP2B).⁶³ Estos pasos coinciden con la hiperacetilación de histonas, lo que puede representar una condición necesaria para las roturas de cadena y permitir la remoción del super-enrollamiento del ADN. Durante el remodelaje de la cromatina en las espermátides, las actividades de condensación de ADN originadas por las protaminas y proteínas, optimizan el proceso de reparación enfatizando el enlace entre una condensación de ADN espermático alterada y la fragmentación del ADN.²⁸

Las roturas de doble cadena de ADN son una lesión que lleva a fragmentación de cromosomas, pérdida de dominios, translocaciones u

otros re-arreglos del genoma.⁶⁴ Algunos de los mecanismos más importantes para reparar este tipo de daño en las células de mamíferos son las recombinaciones no homólogas y homólogas de uniones terminales.⁶⁵ La diferencia entre ambas sería que las reparaciones homólogas utilizan una plantilla no dañada que asegura una reparación exacta, la no homóloga no provee de esta ventaja. Es difícil determinar cuál es la vía más utilizada ya que varía mucho entre los diferentes tipos celulares.²⁸

Las células espermatogénicas difieren en los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena. Una de las vías requiere de la actividad sináptica de PARP-1 y la actividad ligando del complejo ligasa XRCC1-ADN III, que son proteínas involucradas en la escisión de bases y reparación de cadena sencilla.⁶⁶ Las espermátides redondas utilizan esta vía alterna para reparar los daños inducidos por radiación.⁶⁷

Hay evidencia que la estructura de la cromatina ejerce una gran influencia en los procesos de reparación del ADN.⁶⁸⁻⁷⁰ La modulación de la estructura de la cromatina es una importante condición para el reclutamiento y la función de las proteínas de reparación de ADN.²⁸ El primer evento asociado a la rotura de doble cadena fue la fosforilación de H2AX, y se cree que es una plataforma para el reclutamiento o la retención de las moléculas de reparación y señalización de ADN en los sitios dañados.²⁸

Las espermatogonias carecen de una heterocromatina compactada y la detección y señalización del daño al ADN es mediado en ausencia de los complejos H2AX/MDC1. Los daños inducidos por radiación son reparados por mecanismos de proteincinasas independientes.²⁸

En resumen, la reparación del ADN sucede en el espermatozoide en desarrollo, pero una vez que terminan la transcripción y traducción



post-espermogénesis, no existen mecanismos que corrijan el daño que ocurre en su tránsito y almacenamiento en el epidídimo o post-eyaculación.²⁸ No obstante, los ovocitos y embriones tempranos han demostrado su capacidad de reparar algunos tipos de daño del ADN espermático lo que da por resultado que el efecto biológico de la estructura anormal de la cromatina espermática depende del alcance del daño y la capacidad del ovocito de repararlo.²⁸

Fragmentación del ADN: cuantificación

En las últimas dos décadas se han diseñado pruebas para medir la fragmentación del ADN espermático y predecir el efecto que ocasiona en los resultados de fertilidad ya sea tras concepción natural o por reproducción asistida. Las pruebas más utilizadas incluyen:

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUDP nick-end labelling assay).

En 1992, Gavrieli y su grupo⁷¹ describieron una técnica para visualizar muerte celular programada (MCP) *in situ*, preservando así la arquitectura del tejido. Ellos asocian la MCP con fragmentación del ADN, necesaria para el desarrollo biológico y el mantenimiento de tejidos en renovación.⁷¹

El método se basa en la unión específica de la transferasa terminal deoxinucleotidilo (TdT) a las terminaciones 3'OH del ADN, produciendo la síntesis de un polímero de polideoxinucleotido.⁷¹ El TdT se utiliza para incorporar deoxiuridina biotinilada en los sitios de roturas del ADN para luego amplificar esta señal y ser visualizada por microscopio de luz. En su trabajo utilizaron diferentes tejidos demostrando la fragmentación del ADN en sitios como epitelio de intestino delgado timo, y ovario.⁷¹ Es interesante mencionar que también buscaron MCP en tejido endometrial durante la menstruación sin éxito

alguno, confirmando la hipótesis de la descalcación del endometrio por un mecanismo de isquemia tisular.⁷¹

Esta técnica ha mostrado un alto valor predictivo para fertilidad masculina en concepción natural, con 96,5% de sensibilidad y 89,4% de especificidad.^{72,73}

COMET (single cell gel electrophoresis assay).

Ostling y Johanson describieron en 1984 un método para medir el daño del ADN en las células basado en la técnica de microelectroforesis.⁷⁴ Hughes y su grupo⁷⁵ (1996) adaptan esta técnica para su uso en espermatozoides. Las células espermáticas son colocadas en una capa delgada de agarosa y lisadas con detergente en una solución con alta concentración de sal; este proceso elimina las protaminas e histonas y permite al núcleo formar estructuras que contienen asas "súper-enrolladas" de ADN; las condiciones alcalinas del pH provocan un desdoblamiento de las cadenas doble de ADN y la electroforesis permite la migración de las cadenas rotas al ánodo, formando un cola de cometa al ser observado bajo microscopio de fluorescencia, de ahí el nombre de la prueba.⁷⁶ La intensidad de la fluorescencia es dependiente de la cantidad de ADN en la cabeza y la cola, lo que refleja el nivel del daño al ADN que presenta la célula.⁷⁶

Entre sus ventajas se encuentra que solo se necesitan 5000 espermatozoides de una muestra para el análisis, por lo que es útil en pacientes con oligoespermia.⁷⁷ Otras características son que permite detectar grados de daño del ADN en un espermatozoide determinado y que mide roturas de cadena sencilla y doble, así como bases alteradas.⁷⁷

Simon y sus colaboradores⁷⁸ compararon la tasa de nacido vivo posterior a RA dividiendo los grupos en base a la fragmentación del ADN. Se

demostró de manera significativa que la menor fragmentación del ADN espermático resultaba en mayor tasa de nacido vivo.⁷⁸

SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay).

Se utiliza para valorar la calidad seminal en humanos desde principios de los 90.⁷⁹ Esta prueba mide indirectamente la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización por ácido. Inicialmente se trata la muestra de semen con un pH de 1.2 para abrir las cadenas de ADN en los sitios de rotura del mismo, posteriormente, se marcan los espermatozoides con naranja de acridina, un tinte que identifica las cadenas rotas de ADN como rojo fluorescente y las cadenas no rotas como verde fluorescente.⁸⁰

A partir de los resultados obtenidos mediante la técnica SCSA se desarrolló el índice de fragmentación⁸¹ que describe la proporción de espermatozoides rojo fluorescente que contienen las roturas de ADN en relación con los espermatozoides teñidos en verde que no tienen fragmentación. Se puede afirmar que la técnica SCSA es la más estudiada desde el punto de vista clínico,³⁴ aunque las tres pruebas son referidas constantemente en trabajos científicos^{6,82} para detectar fragmentación del ADN.^{12,83-89}

SCDt (Sperm Chromatin Dispersion Test).

Al llevar a cabo la desnaturalización ácida y remoción de proteínas nucleares en espermatozoides humanos y una posterior tinción fluorescente, se observan unos halos característicos de las cadenas de ADN sanas que pueden ser observados bajo microscopía de fluorescencia o con microscopio de campo claro previa tinción con Diff-Quik. Si existe fragmentación o daño en estas cadenas, no se forman los halos o su presencia es mínima. Así es como Fernández y su grupo (2003)⁹⁰ introdujeron la prueba de dispersión de cromatina en el espermatozoide

(SCD). Su estudio incluyó 30 pacientes (20 de ellos con infertilidad y 10 donantes de semen) y utilizaron como control, la detección de roturas de ADN por FISH.

En realidad, la prueba SCDt mide la ausencia de daño, no la cantidad de ADN que lo presenta. Es una técnica sencilla, rápida y altamente reproducible. Se comercializa en forma de kit y por lo tanto no requiere de una instrumentación compleja y es fácilmente evaluada por técnicos de laboratorio.⁹⁰ La mayor limitación es que la tinción fluorescente demuestra ser más sensible que la Diff-Quik, obligando a tener en un laboratorio, microscopía de fluorescencia para una mejor discriminación.⁹¹

Halosperm®

Con el propósito de simplificar, reducir costes y disminuir el tiempo de trabajo en el laboratorio, se desarrolló un kit basado en la prueba SCDt, llamado Halosperm®, que ha demostrado una buena correlación para la valoración de la fragmentación del ADN espermático.⁹¹

Resumiendo, el Halosperm® consiste en tomar una alícuota de semen y diluirla a 10 millones/mL en PBS (Phosphate-buffered saline). El equipo incluye tubos eppendorf con alícuotas de gel de agarosa y se colocan en baño maría entre 90 a 100°C durante 5 minutos hasta fusionarlo con la agarosa, luego se dejan en baño maría a 37°C. Después de 5 minutos de incubación, 60 mL de la muestra de semen diluida se añaden al los tubos eppendorf y se combinan con la agarosa fusionada. Del compuesto semen-agarosa, se toman 20µL en laminillas pre-bañadas con agarosa y se cubren con cubreobjetos de 22 por 22 mm. Las laminillas se colocan en una placa de frío dentro de un frigorífico a 4°C durante 5 minutos para permitir que la agarosa produzca un microgel con los espermatozoides en



su interior. Los cubreobjetos se retiran y las laminillas se introducen horizontalmente en una solución ácida y se incuban durante 25 minutos. Después de lavar por 5 minutos con abundante agua destilada, las laminillas son deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol por dos minutos y después se dejan secar al aire.⁹¹

Las laminillas se pueden almacenar a temperatura ambiente por varios meses en una caja cerrada en la oscuridad. Se pueden teñir para microscopía de fluorescencia utilizando DAPI (Roche Diagnostics) en Vectashield (Vector Laboratories), para microscopía de campo brillante o incubarse con una sonda de genoma para DBD-FISH. Para la microscopía de campo brillante, las laminillas se cubren horizontalmente con una mezcla de solución de tinción de Wright (Merck) y PBS (Merck) por 5-10 minutos con flujo de aire continuo. Las laminillas son lavadas en agua de grifo y se dejan secar.⁹¹

En el trabajo realizado por Fernández y sus colegas (2005)⁹¹ donde introducen el equipo Halosperm®, compararon su uso contra el test que se consideraba el patrón de referencia: SCSA. Enumeran las ventajas del equipo en las diferentes etapas del procesamiento de la muestra:

a. *Mejorías técnicas.* El protocolo original de la prueba SCD era inadecuado para la microscopía de campo brillante, sin embargo, el equipo Halosperm se mostró menos agresivo, con una mejor conservación de la cromatina y mantuvo una densidad más alta del material, por lo que los halos podían teñirse con mayor precisión y ser evaluados utilizando la microscopía de campo brillante con tinción de Wright. Las colas de los espermatozoides permanecen intactas, esto hace que la diferenciación contra otros tipos celulares se realice con mayor facilidad.⁹¹

b. *Variaciones en el puntaje.* Para determinar la variabilidad interobservador en el puntaje de espermatozoides con ADN fragmentado, se distribuyó una alícuota de muestra de semen congelada a tres laboratorios diferentes y procesada utilizando el kit Halosperm. Cuatro técnicos analizaron 500 espermatozoides tres veces al día en dos días distintos. La prueba de χ^2 no detectó diferencias significativas ($p > 0.05$) en los resultados. La variabilidad intraobservador se estimó a partir de los seis puntajes para cada técnico y estuvo en el rango de 6 a 12%.⁹¹

c. *Comparación con SCSA.* La comparación se hizo por medio de 45 muestras de semen de pacientes que acudían al Centro de Medicina Reproductiva de la Universidad de Minnesota y a los cuales se les realiza simultáneamente ambos estudios. Se observa una concordancia entre las dos técnicas alta (Coeficiente de correlación intraclass R:0.85), obtenido por análisis de Altman.⁹¹

d. *Detección de daño al ADN inducido por radicales.* Para demostrar la sensibilidad del nuevo test (Halosperm), se tomaron alícuotas de tres diferentes pacientes y se expusieron a concentraciones crecientes de SNP por 1 hora para inducir daño al ADN. Los pacientes 1 y 2, que tenían una baja fragmentación del ADN, mostraron un incremento similar en cuanto a la fragmentación al incrementar las dosis de SNP. El sujeto 3 tenía una fragmentación previa del 52% y posterior al tratamiento se indujo fragmentación en prácticamente la totalidad de la población espermática.⁹¹

e. *Aplicación clínica a muestras de semen.* Se comparan tres grupos: i) varones con fertilidad probada ($n=9$); ii) varones normozoospérmicos ($n = 46$) y iii) varones

con oligoastenoterazoospermia ($n = 23$). El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en el grupo fértil fue de 5.2 a 23% (media 16.3 ± 6). Este valor fue significativamente más alto ($p = 0.008$) en pacientes normozoospérmicos (rango de 8.6 a 51.8 con media de 27.3 ± 11.7) y aún se observó mayor significancia ($p < 0.000001$) en el grupo de oligoastenoterazoospermia (rango de 23.2 a 85.8 con media de 47.3 ± 17.3).⁹¹

Las mayores ventajas del equipo de Halosperm® son la poca variabilidad intra-individual e inter-individual, que reflejan la facilidad y reproducibilidad de la prueba.⁹¹

Enciso y su equipo⁹² analizaron la capacidad del kit de Halosperm® para evaluar diferentes patrones de daño de ADN nuclear dentro de cada espermatozoide. En una muestra de 194 pacientes (18 con varicocele, 51 normoespérmicos, 103 con alteraciones en el análisis seminal y 22 fértiles), no encuentran diferencias en el porcentaje de fragmentación ADN espermático entre tres de los diferentes grupos, sin embargo en los pacientes con varicocele se observó el mayor daño al ADN nuclear.⁹²

El uso del Halosperm® ha tenido buenos resultados según lo afirma Fernández y cols., además, su equipo también a descrito y recomiendan su uso combinado con Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) para detectar aneuploidías en los mismos espermatozoides tratados con el kit, de este modo se pudiera estudiar una posible correlación entre la fragmentación del ADN y anomalías cromosómicas.⁹³

Pregl Breznik y sus colegas⁹⁴ compararon diferentes pruebas de función espermática: ensayo de unión a hialuronidasa, Halosperm® e hiperactividad. El estudio incluyó 133 parejas que se sometieron a tratamientos de FIV-ICSI y

cuyas mujeres no presentaban endometriosis, ovarios poliquísticos o síndrome de ovario poliquístico. Entre los criterios de inclusión estaba el diagnóstico de factor masculino leve (concentración de espermatozoides en el eyaculado por encima de $5 \times 10^6/\text{mL}$ pero menor a $15 \times 10^6/\text{mL}$, y porcentaje de motilidad entre 25 y 40%), parejas con varias inseminaciones intrauterinas fallidas y parejas con infertilidad idiopática. Solo se incluyen parejas donde se logran obtener al menos 6 ovocitos tras la aspiración folicular. Se obtienen un total de 1760 ovocitos de los cuales 883 se utilizan en FIV y 878 para ICSI. Las parejas se dividieron en dos grupos según su tasa de fertilización posterior a FIV: Grupo 1, tasa de fertilización menor de 50%; y Grupo 2, tasa de fertilización mayor de 50%. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en términos de porcentajes de espermatozoides con la capacidad de unirse a la hialuronidasa ($p=0.019$) y el porcentaje de fragmentación del ADN ($p = 0.004$). Estos resultados se analizaron mediante curvas de ROC dando significancia estadística (punto de corte del 6.45%, con sensibilidad de 88.5% y especificidad de 44.8%; AUC^{ROC} 0.664, IC 0.538-0.790; $p=0.007$). Se observó una correlación negativa de las tasas de fertilización y calidad embrionaria con la fragmentación del ADN espermático. Concluyeron que las tres pruebas evaluadas son útiles para predecir la tasa de fertilización tras FIV convencional, que son métodos que pueden realizarse en un tiempo menor a dos horas y que deberían sumarse al análisis seminal de rutina para ayudar a tomar la decisión de utilizar FIV o ICSI. Destacan que el Halosperm® es útil para predecir los resultados del desarrollo embrionario.

Fragmentación de ADN y embarazo

Las consecuencias del daño del ADN en la fecundación y embarazo las han analizado varios autores. Son clásicas las observaciones de que en muestras de semen que presentan parámetros



alterados en el espermiograma y bajas tasas de fecundación y división en fecundación in vitro se observan proporciones aumentadas de espermatozoides con fragmentación de ADN.^{95,96}

Henkel y sus coautores⁹⁷ evaluaron la fragmentación del ADN espermático y apoptosis utilizando las técnicas de TUNEL, unión a anexina V, tinción de naranja acridina y expresión de Fas, en 249 pacientes seleccionados aleatoriamente. Observaron diferencia significativa entre los espermatozoides negativos o positivos a TUNEL en tasa de embarazo (34.65% vs 19.05%; p = 0.0344). Establecen que la probabilidad de una mujer de lograr embarazo es casi el doble si el porcentaje de espermatozoides positivos a TUNEL es bajo (<36.5%) y el porcentaje de cromatina espermática intacta es alto (>12%). Concluyeron que los procesos apoptóticos en el espermatozoide no juegan un papel en la fecundación pero resultan deletéreos para el embarazo como consecuencia de la activación del genoma paterno y que la fragmentación del ADN espermático debida a factores externos es más importante que la apoptosis.⁹⁷

Tesarik y su grupo (2004)⁹⁸ compararon un grupo de 18 parejas con tres procedimientos de RA fallidos y ovocitos donados contra un grupo control de 18 parejas escogidas al azar en su primer intento de reproducción asistida y que compartían la misma donante de óvulos. Los resultados los presentan en dos categorías, efecto paterno temprano y efecto paterno tardío. En el primero, se observa una tasa de fecundación mayor de 50% pero con menos de 25% de cigotos de buena calidad para el grupo experimental; mientras que en el grupo control, prevalecen zigotos de buena morfología. Al comparar los parámetros seminales básicos, no hubo diferencia entre grupos y las tasas de fragmentación fueron muy similares, sin encontrar diferencia estadística. En la categoría de efecto paterno tardío, ambos grupos resultaron similares a excepción

de encontrar una mayor fragmentación de ADN en el grupo experimental. En ambas categorías, la tasa de embarazo es significativamente mayor a favor de los grupos control (p<0.001). Concluyen que la fragmentación del ADN espermático debe ser evaluada en casos de fallo de ICSI sin alteraciones aparentes en la morfología embrionaria y, si existen alteraciones en la morfología de los embriones, debe sospecharse un factor paterno aún en ausencia de niveles anormales de fragmentación espermática.⁹⁸

La fragmentación de ADN se ha relacionado con el déficit de protamina en el espermatozoide (mayor fragmentación en los espermatozoides deficitarios) por Nasr-Esfahani y colaboradores apoyan la idea de que el daño del ADN no altera la fecundación pero sí el potencial del zigoto para alcanzar el estadio de blastocisto.⁹⁹ Para llegar a estas conclusiones, valoraron 28 muestras de semen de parejas referidas para ICSI. La fragmentación del ADN espermático se evaluó por COMET y la deficiencia de protamina por tinción de CMA3. Observaron una correlación significativa entre la deficiencia de protamina y la tasa de fertilización post-ICSI (p = 0.002). Sugieren que aunque la selección de espermatozoides es aleatoria en términos de daño al ADN, existe un mecanismo de control que opera después del procedimiento para asegurar que solamente aquellos cigotos con un genoma relativamente intacto continúe su desarrollo.⁹⁹

En una revisión, Aitken y Baker (2006, Australia) resumieron de la siguiente manera los problemas reproductivos asociados a la fragmentación de ADN espermático. El espermatozoide es muy sensible al estrés oxidativo que induce daños en su membrana plasmática y fragmentación del ADN tanto a nivel del núcleo como a nivel mitocondrial. Las alteraciones de la membrana pueden anular su capacidad fecundante pero, en ocasiones, la fecundación puede producirse y, si existen daños en el ADN que no son repa-

rados, pueden producirse mutaciones asociadas a pérdidas gestacionales y a distintas patologías de la descendencia, incluido el cáncer infantil.¹⁰⁰

Fragmentación del ADN y correlación con parámetros seminales.

El análisis seminal continúa siendo el paso inicial en la valoración del varón estéril.¹⁰¹⁻¹⁰³ El manual más reciente publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010 para el examen y procesamiento del semen humano, constituye una versión muy completa que provee descripciones detalladas de los métodos y sus limitaciones.¹⁰⁴ Sin embargo, sin restarle importancia a las guías de la OMS para la estandarización y evaluación del semen, la interpretación diagnóstica del análisis seminal sigue estando sujeta a investigación.¹⁰¹

La información obtenida por los parámetros seminales convencionales, refleja hasta cierta medida, la calidad del proceso espermato génico que a su vez determina la competencia funcional del espermatozoide y su potencial para fecundar.¹⁰⁵ Una desviación de uno o más de los parámetros seminales sobre los rangos de referencia, puede indicar que hay un factor masculino implicado en el problema de esterilidad.¹⁰⁶

La correlación de la fragmentación del ADN con los parámetros seminales convencionales ha llevado a conclusiones ambiguas.¹⁰⁷ La mayoría de los estudios demuestra una correlación inversa entre la tasa de fragmentación del ADN y la calidad espermática (concentración, motilidad, vitalidad y morfología) sin importar la edad de los sujetos examinados.¹⁰⁸⁻¹¹²

Se ha establecido una relación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y fragmentación del ADN.^{110,113} Es-

tructuras anormales de cromatina y roturas de cadena de ADN se correlacionan con formas severas de anomalías morfológicas como la megalocefalia y múltiples colas¹¹⁴ o la incidencia de globozoospermia acompañada de tasas altas de aneuploidía.¹¹⁵

En contraste, otros estudios no han demostrado relación alguna entre las variables seminales tradicionales como la concentración espermática, motilidad o morfología estricta y los índices de fragmentación del ADN.^{32,116,117} Hay evidencia además, que en grupos específicos de pacientes como aquellos portadores de translocaciones o que padecen algún tipo de cáncer, las aberraciones cromosómicas espermáticas no siempre se acompañan de características seminales anormales.¹¹⁸

En una revisión reciente por Evgeni y su grupo¹⁰¹ explican que una desviación de uno o más de los parámetros seminales sobre los rangos de referencia no necesariamente implica infertilidad, las limitantes inherentes de estos métodos de evaluación en combinación con la naturaleza variable del semen humano y el nivel de experiencia de los laboratorios seminales^{115,119} puede generar que se sobrelapen los varones fértiles con aquellos que experimentan infertilidad.^{32,102,120} Es por esto que subrayan la necesidad de pruebas que investiguen la integridad funcional y molecular del espermatozoide.¹⁰⁵

Por lo que se refiere al tema de controversia entre la correlación de los parámetros seminales convencionales y la fragmentación del ADN, Evgeni y su grupo¹⁰¹ enumeran los siguientes factores que influyen en el tema:

- i. Variabilidad en los métodos para evaluar la integridad del ADN.¹²¹ La mayoría de los estudios utiliza diferentes métodos para evaluar el daño sobre al ADN y esto no genera resultados comparables.



- ii. Variabilidad en la metodología y los criterios aplicados en el análisis de los parámetros seminales convencionales.¹²¹ Las diferentes técnicas que existen para evaluar la cuenta espermática y la morfología pueden afectar la precisión de los resultados.
- iii. Control de calidad en las pruebas seminales.¹⁰¹ Raramente se menciona si las pruebas seminales se sometieron a un esquema de control de calidad, con el propósito de asegurar la exactitud y disminuir la subjetividad en los resultados.
- iv. Falta de uniformidad en los criterios de selección para los grupos estudiados.¹²² Es posible que los resultados de diferentes subgrupos de pacientes no sean siempre comparables.

Fragmentación del ADN y tabaquismo

El tabaco es reconocido como un riesgo para la salud y su consumo permanece ampliamente difundido en la sociedad,¹²³ es conocido que los fumadores están expuestos a más de 4000 componentes tóxicos derivados del tabaco.¹²⁴ Estudios epidemiológicos clásicos, evidencian los efectos relacionados a la dosis de consumo, tanto en el varón como en la mujer, que resultan en el retraso de concepción de alrededor de dos meses^{125,126} y en el adelanto de la menopausia.¹²⁷

Durante la combustión del tabaco se forma benzopireno, un compuesto que es metabolizado por enzimas del grupo P450 a benzopirenodiol-epóxido (BPDE), el cual tiene el potencial de unirse covalentemente con el ADN formando compuestos denominados aductos.¹²⁸ En los espermatozoides, se observa un incremento de estos compuestos en el ADN de pacientes fumadores.¹²⁹

El principal alcaloide del tabaco es la nicotina, está presente en cantidades que varían entre

0.8 y 1.8 mg por cigarrillo dependiendo de la marca y el tamaño del mismo.^{130,131} La cotinina, su principal metabolito, es un compuesto más estable que la nicotina y tiene una vida media de 20 horas (la de la nicotina es de 2 hrs). En el varón, se detecta nicotina y/o cotinina en el plasma seminal de varones según su grado de consumo.¹³²⁻¹³⁴ Esto indica que el metabolito atraviesa la barrera hemato-testicular.

Los constituyentes del tabaco reaccionan directamente con el espermatozoide dañando al ADN. Algunas de las formas de daño son las siguientes:

- i. Alteración del número de cromosomas. A través de un mecanismo de disruptión de la función del huso meiótico del espermatozoide.
- ii. 8-hidroxidexyguanosina (8-OHdG). Un metabolito principal del daño al ADN, sus concentraciones se correlacionan con el tabaco y la cotinina plasmática seminal.
- iii. Cadmio y nicotina/cotinina, se incorporan al ADN y forman uniones covalentes por lo que la transmisión del ADN alterado de espermatozoides de fumadores a su descendencia, se asocia con un aumento al riesgo de cáncer infantil¹²³
- iv. Daño oxidativo. Debido a la generación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres. Se sabe que además los radicales libres tienen capacidad de unirse al ADN y producir nudos.
- v. Transmisión genética. Debido que el espermatozoide eyaculado tiene una mínima capacidad reparadora,¹³⁵ la formación de aductos relacionados con el tabaco es una fuente potencial de daño al ADN. En un estudio de 27 embriones preimplantatorios en el estadio de 4-8 células, la proporción de blastómeras que

reaccionaron a la presencia de benzopíreno fue mayor en embriones de parejas fumadoras (padre, madre o ambos) que en embriones de aquellas parejas sin ningún progenitor fumador.¹³⁶

La transmisión paterna del daño al ADN puede comprometer el desarrollo embrionario in útero, llevando a fallo de implantación, pérdida gestacional temprana o alteraciones del desarrollo postnatal.¹²³

Sepaniak y sus colegas no encuentran diferencias entre los parámetros seminales básicos (motilidad, viabilidad y morfología) de varones fumadores y no fumadores, sin embargo, hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grado de fragmentación de ADN nuclear a favor de los pacientes fumadores (32%) en contra de los no fumadores (25.9%), $p < 0.01$.¹³⁷

Niu y sus equipo (2010)¹³⁸ revisaron 784 casos de infertilidad masculina agrupando los pacientes en no fumadores y fumadores, cuánto fumaban (menos de 10, 11-19 y más 20 cigarrillos al día) y por cuánto tiempo han fumado (menos de 5, 6-9 y más de 10 años). La fragmentación de ADN fue medida por SCSA y citometría de flujo. El índice de fragmentación del ADN fue significativamente superior en el grupo de fumadores ($p < 0.05$), encontrando además correlación con la tasa de malformación espermática ($r = 0.31$, $p < 0.05$).

Fragmentación del ADN y reproducción asistida

El efecto de altos niveles de fragmentación del ADN espermático en términos de reproducción asistida es controvertido. Si hablamos de espermatozoides provenientes del eyaculado, se ha demostrado repetidamente que el daño al ADN evaluado por TUNEL o COMET se correlaciona negativamente (significancia estadística) con la

fertilización y tasa de embarazo tras la fertilización in vitro.^{87,139}

Algunos estudios sugieren que utilizando la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) se puede mejorar la tasa de embarazo clínico en varones con un alto nivel de fragmentación de ADN espermático^{5,11,77,140} mientras que otros presentan resultados contradictorios.^{85,141,142}

Después de haber establecido que una proporción importante de espermatozoides móviles en varones con infertilidad presenta fragmentación del ADN, Lopes y colaboradores⁹⁶ evalúan la presencia de ADN fragmentado tanto en ovocitos como espermatozoides mediante la prueba de TUNEL. Para su estudio, desarrollado en Toronto, Canadá, obtienen 102 ovocitos en los cuales se practicó ICSI y ninguno mostró evidencia morfológica de fertilización a las 18-20 horas del procedimiento. De los 102 ovocitos, en 17 no se observó presencia de ADN paterno; en 26 de ellos se observaron espermatozoides que permanecían condensados, y por último, en 33 espermatozoides hubo descondensación de la cromatina. Una cuarta parte del total (26 espermatozoides) presenta fragmentación del ADN espermático, un hecho que implica la importancia de la selección espermática previa al ICSI.⁹⁶

Evenson y Wixon,¹⁴⁰ revisan 17 estudios ($n=2109$) donde miden la fragmentación de ADN a través de tres técnicas, SCSA, TUNEL y comet. Observan que parejas sin problemas de fertilidad y parejas con infertilidad tratadas con inseminación intrauterina y que presentan un índice de fragmentación del ADN (DFI) $<30\%$ tienen 7.0 y 7.3 veces más probabilidades de alcanzar un embarazo/parto que aquellas con DFI mayor. Es importante definir que este resultado solo se observa cuando se utiliza SCSA como técnica de medición de fragmentación del ADN espermático.



En el meta-análisis por Li y cols,¹⁴³ en donde incluyen ocho estudios (cinco donde se mide fragmentación ADN espermático por TUNEL y tres mediante SCSA) con una muestra de 299 casos, la tasa de embarazo clínico en FIV convencional disminuye en pacientes con alto grado de daño espermático de manera significativa comparando con aquellos que no presentan alteraciones en el ADN (RR 1.17, IC 95% 1.07-1.28, p=0.0005). Sin embargo, este efecto solo es demostrable utilizando TUNEL como técnica de cuantificación para el ADN.

Zini y cols,¹⁴⁴ tras revisar 28 estudios (n=3226), asocian el daño al ADN espermático con una pobre calidad y alteraciones en el desarrollo de embriones resultantes de FIV, ICSI o ambos.

Más recientemente en 2014, Osman y cols⁸² realizaron un meta-análisis sobre los efectos de la fragmentación del ADN espermático en la tasa de nacido vivo posterior a FIV convencional o ICSI. Analizaron seis estudios que presentaban todos los criterios de inclusión (n=998), tres de ellos miden los niveles de fragmentación de ADN espermático por SCSA, dos por TUNEL y 1 por comet. Concluyen que la tasa de nacido vivo, posterior a FIV convencional, se incrementa de manera significativa en parejas con baja fragmentación espermática comparada con aquellas con un alto grado de fragmentación (RR 1.17, IC 95% 1.07-1.28, p=0.0005).

En otra revisión sistemática y meta-análisis, por Zhao y cols,⁶ después de revisar 16 estudios de cohortes (3106 parejas) muestran que altos niveles de fragmentación del ADN espermático tienen un efecto deletéreo sobre los resultados de FIV/ICSI (baja tasa de embarazo e incremento en tasa de aborto) y concluyen que las pruebas para medir y valorar el daño al ADN deben ser recomendadas en aquellos casos con fallo repetido en lograr un embarazo.

En el Cuadro 1 se resume las conclusiones de los principales meta-análisis.

El uso de ICSI ha prevalecido sobre la FIV convencional en varones con una alta fragmentación de ADN. Los mejores resultados se atribuyen en parte al proceso de selección de espermatozoides móviles morfológicamente normales.⁸² También se ha propuesto que la esperada alta proporción de mujeres sanas en el grupo de tratamientos con ICSI provee de ovocitos de mejor calidad que reparen el ADN alterado.⁷⁷

No obstante, la alta tasa de aborto espontáneo que se reporta tanto en FIV convencional como en ICSI en varones con altos niveles de fragmentación espermática comparado a aquellos con poca o nula fragmentación, sugiere que el efecto dañino persiste sin importar la técnica utilizada.^{36,145} Esto hace cuestionarse las teorías sobre mejores resultados clínicos por la técnica de ICSI.

DISCUSIÓN

Podemos afirmar que la fertilización de ovocitos metafase II por espermatozoides con daño en el ADN se traduce en defectos del desarrollo embrionario, fallo de implantación y alta tasa de aborto.^{81,85,146-150} Aunque los ovocitos maduros reparen en cierto grado el daño del ADN espermático, este no es el caso en la mayoría de las pacientes que vemos en la consulta de un centro de reproducción.

Si tomamos en cuenta que los altos niveles de fragmentación del ADN espermático influyen de manera negativa en los resultados de reproducción asistida, el mejorar la calidad de la muestra y la selección de un espermatozoide sano parecen ser las medidas en donde enfocar el manejo.

Cuadro 1. Meta-análisis de fragmentación del ADN y reproducción asistida.

Año	Autor	Estudios evaluados	Conclusiones
2006	Evenson y Wixon [140]	17 estudios (n=2109)	Parejas con DFI* <30% tienen 7.0 y 7.3 veces más probabilidades de alcanzar un embarazo/parto que aquellas con DFI mayor
2006	Li [143]	5 estudios (n=299)	La tasa de embarazo clínico en FIV convencional disminuye en pacientes con alto grado de daño espermático (RR 0.68, IC 95% 0.54-0.85, p=0.006)
2011	Zini [144]	28 estudios (n=3226)	El daño al ADN espermático se asocia con pobre calidad y alteraciones en el desarrollo embrionario.
2014	Osman [82]	6 estudios (n=998)	La tasa de nacido vivo posterior a FIV convencional, se incrementa en parejas con baja fragmentación espermática (RR 1.17, IC 95% 1.07-1.28, p=0.0005)
2014	Zhao [6]	16 estudios (n=3106)	Altos niveles de fragmentación del ADN espermático se asocian con una disminución en la tasa de embarazo y un aumento en la tasa de aborto tras FIV/ICSI.

* DFI: DNA Fragmentation Index (índice de fragmentación del ADN)

Mejorar calidad de la muestra espermática

Si tomamos en cuenta que una de las principales causas de fragmentación del ADN espermático son los radicales libres de oxígeno [28, 34] y que el tabaco contiene altas concentraciones de radicales libres e induce la producción celular de especies reactivas de oxígeno,¹⁵¹⁻¹⁵² será por lo tanto de suma importancia, el cese del consumo de tabaco por el varón.

Santos y cols¹⁵³ observaron una mejoría estadísticamente significativa en los parámetros seminales de varones que suspendieron el consumo de tabaco por tres meses con respecto a los valores previos encontrados en el seminograma. Describen una mejoría en la cuenta de espermatozoides por eyaculado de 29 millones a 72 millones, la motilidad mejora de un 33% a un 79% y la cuenta de espermatozoides grado A después de swim-up aumentó de 3 millones a 23 millones por eyaculado.

Es importante el apoyo integral sobre el varón y su pareja para el cese del consumo de tabaco. Existen muchas opciones como el apoyo psicológico, terapia farmacológica e incluso acupuntura y medicina alternativa. En este último caso, la acupuntura ha demostrado tener buenos resultados;¹⁵⁴ sin embargo, un meta-análisis reciente¹⁵⁵

concluye que la evidencia no es consistente y libre de sesgo, por lo que sugieren el desarrollo de nuevos estudios aleatorizados y controlados para tomar conclusiones definitivas.

Preparación de la muestra seminal

El primer paso en la selección del espermatozoide para utilizar en una técnica de reproducción asistida, es la preparación del semen. De las técnicas que se utilizan actualmente, la centrifugación en gradientes con swim-up es el procedimiento que consigue la mayor disminución en la tasa de fragmentación de ADN espermático.¹⁵⁶ Estos hallazgos han sido confirmados por diversos investigadores.^{157,158}

Esto se traduce en que la misma preparación espermática para trabajar la muestra seminal y realizar alguna técnica de reproducción asistida, nos mejora la calidad del semen sin necesidad de utilizar otro procedimiento costoso y complejo.

Por otra parte, ha sido desarrollado un método de separación de espermatozoides que utiliza anexina V para fijar los espermatozoides con daño en su ADN, dejando la muestra enriquecida con espermatozoides cuyo ADN está íntegro y preparada para ser utilizada en el procedimiento de reproducción asistida.¹⁵⁹ Distintos autores



han comunicado buenos resultados con el uso de esta técnica.¹⁶⁰⁻¹⁶³

El mismo concepto de seleccionar espermatozoides que han llevado una espermatogénesis normal, es la prueba conocida como unión a ácido hialurónico (HA). El espermatozoide humano que se une al HA presenta características similares a aquellos que se unen a la zona pelúcida: mínima fragmentación del ADN, forma normal, baja frecuencia de aneuploidías cromosómicas.¹²⁰ Jakab y cols¹⁶⁴ observaron que la selección de espermatozoides unidos a HA disminuye de manera significativa el porcentaje de espermatozoides que muestran marcadores proteicos de apoptosis y aneuploidias.

Aunque se han observado buenos resultados cuando se compara ICSI convencional contra ICSI con espermatozoide unido a HA como en el estudio de Parmegiani y cols,¹⁶⁵ Tarozzi y cols¹⁶⁶ afirman su falta de utilidad en el contexto del uso limitado de ovocitos debido a la ley italiana. En una revisión por Sakkas 2013¹⁶⁷ se sugiere que aunque los resultados clínicos son prometedores, esta técnica no es tan efectiva si el varón presenta una muy baja cuenta espermática y/o motilidad.

Tipo de daño, extensión y reparación del ADN espermático

La fragmentación del ADN puede ser de cadena sencilla o doble,³⁴ esto tiene implicaciones debido a que el daño de cadena doble se relaciona con inestabilidad genómica, fragmentación de los cromosomas, pérdida de dominios en los cromosomas, translocaciones, desarreglos y muerte celular, haciéndolo más difícil de reparar y con un peor pronóstico para el desarrollo e implantación del embrión.^{28,64}

A pesar de estudios como el de Greco y cols,⁴⁹ en donde muestra que la microinyección con espermatozoides que presentan fragmentación

del ADN superior a 15% (TUNEL) presentan tasas de embarazo del 5.6% contra el 44.4% si la fragmentación es menor al 6%, no se ha logrado determinar la cantidad de daño exacta que puede ser reparada, ya sea por el ovocito o el blastocisto.

Ahmadi y cols¹⁶⁸ sugieren que el ovocito tiene la capacidad de reparar daño al ADN espermático en no más de un 8%. Son muchos los factores que intervienen para poder confirmar este valor. Lo que si está claro, es que la capacidad depende no solamente del tipo de daño y la extensión, sino también de la maquinaria intrínseca del ovocito.

Hay básicamente tres opciones que pueden ocurrir una vez que la célula experimenta daño al ADN:²⁸ 1) activación de los mecanismos de apoptosis, lo que culmina en la muerte celular; 2) soportar el daño, esto puede llevar a mutaciones para la siguiente generación; y 3) reparar la lesión, activar los mecanismos de protección que corrigen los daños al ADN.

Debido a que un espermatozoide maduro no es capaz de activar mecanismos de reparación propios, la responsabilidad recae en el ovocito. Podemos afirmar que la delección o errores en la secuencia a causa de una reparación parcial del ovocito, nos resulta en una descendencia anormal. Se sabe que el 80% de las aberraciones estructurales cromosómicas de novo en el humano, son de origen paterno.²⁸

En el 2009, Jaroudi y cols,¹⁶⁹ mediante análisis por microarray detectaron un gran número de genes “reparadores” indicando que todas las vías de reparación del ADN son potencialmente funcionales en ovocitos y blastocistos humanos. No hay información que nos diga si es posible incrementar la capacidad de reparación del ADN del ovocito, pero lo que si está claro es que conforme aumenta la edad materna, el RNA

mensajero almacenado en los ovocitos disminuye y con ello, la reparación eficiente del ADN.¹⁷⁰

FIV o ICSI

Una de las decisiones más controvertidas en el laboratorio es decidir si llevar a cabo FIV convencional o ICSI para la fecundación de ovocitos.

La hipótesis de que la selección natural del espermatozoide que ocurre en una FIV conlleva a la selección de un espermatozoide con menos daño del ADN es demostrada por Borini y cols.⁸⁵ Ellos encontraron que al analizar 82 ciclos de FIV y 50 ciclos de ICSI hay una relación entre los altos índices de fragmentación de ADN espermático y las tasas de embarazo clínico y aborto observada solamente en el grupo de ICSI ($P=0.007$ y $P=0.009$, respectivamente). Otros autores no han obtenido resultados similares, demostrando tasas bajas de embarazo clínico en pacientes con altos niveles de fragmentación sin importar la técnica utilizada.^{141,171}

Además, las altas tasas de aborto espontáneo que se observan tanto en FIV como en ICSI en varones con un alto grado de fragmentación del ADN espermático comparados con varones con bajo grado de fragmentación, sugieren que el efecto negativo persiste sin importar el método de fertilización.^{36,145}

Aunque es una muestra pequeña, un estudio reciente por Ming y cols., compara 164 ciclos con ovocitos de hermanas y el uso combinado de FIV/ICSI. Reporta mejores resultados con el uso de ICSI que la FIV convencional, en términos de porcentaje de clivaje (98.99 vs 96.81%), porcentaje de embriones bloqueados (13.95 vs 20%) y porcentaje de fertilización anormal 0.854 vs 3.63%).¹⁷²

La decisión sobre qué técnica es superior, FIV o ICSI, es discutible. No obstante, lo que si pode-

mos afirmar, es que el uso de ICSI ha superado por más del doble al de la FIV convencional en Europa.¹⁷³ Sin embargo, los porcentajes de embarazo y de nacido vivo, son ligeramente superiores con esta última modalidad.¹⁷³

Selección espermática

Tal vez la clave para descartar espermatozoides con daño al ADN no recaiga en las pruebas de fragmentación del ADN espermático, sino en seleccionar aquellos que demuestren las mejores características y propiedades.

No es el propósito de esta revisión el profundizar en este tema, por lo que recomendamos diferentes lecturas como el trabajo de Sakkas y cols.¹⁷⁴ del 2015 donde hacen una revisión de la selección espermática fisiológica y las técnicas utilizadas actualmente en los laboratorios de reproducción asistida además de algunas que están en desarrollo. Podemos destacar técnicas como la unión de espermatozoides al ácido hialurónico, la selección espermática a través de microscopía de alta magnificación (6600x, IMSI), unión a anexina V, y también presentan una breve descripción sobre las técnicas "omics", como la transcriptómica, proteómica y metabolómica.¹⁷⁴

CONCLUSIÓN

No cabe ninguna duda que la integridad del genoma de ambos gametos es crucial para lograr un embarazo exitoso que culmine con un recién nacido vivo sano. El papel de las pruebas actuales utilizadas para detectar y cuantificar los daños del ADN sobre el espermatozoide dista mucho de ser esencial debido a la falta de estándares, reproducibilidad y complejidad para realizarlas. Además, uno de los mayores obstáculos es que el uso de alguna de estas técnicas no es clínicamente útil, solo predictivo.



El avance en el conocimiento de la fisiología espermática y el desarrollo de nuevas y mejores técnicas de selección de espermatozoides para su uso en reproducción asistida, nos llevarán a cumplir la meta deseada sopesando de esta manera, el gran obstáculo que representa actualmente la gran complejidad del genoma humano.

REFERENCIAS

1. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM: Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985, 291(6510):1693-1697.
2. Chung CC, Fleming R, Jamieson ME, Yates RW, Coutts JR: Randomized comparison of ovulation induction with and without intrauterine insemination in the treatment of unexplained infertility. *Human reproduction* 1995, 10(12):3139-3141.
3. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernandez JL: Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertility and sterility* 2010, 93(1):314-318.
4. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, Thonneau P: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and sterility* 2008, 90(5):1792-1799.
5. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A: Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human reproduction* 2007, 22(1):174-179.
6. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y: Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility* 2014, 102(4):998-1005 e1008.
7. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE: Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and sterility* 2011, 95(2):652-657.
8. Simon L, Lewis SE: Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Syst Biol Reprod Med* 2011, 57(3):133-138.
9. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M: Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and sterility* 2003, 80(6):1404-1412.
10. Lewis SE: Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 2007, 134(1):31-40.
11. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* 1998, 69(3):528-532.
12. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A et al: Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human reproduction* 2004, 19(6):1409-1417.
13. Ris H, Mirsky AE: The state of the chromosomes in the interphase nucleus. *The Journal of general physiology* 1949, 32(4):489-502.
14. Williamson R: Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *Journal of molecular biology* 1970, 51(1):157-168.
15. Kitazumi I, Tsukahara M: Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J* 2011, 278(3):427-441.
16. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC: Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry Cell Biol* 2008, 129(1):33-43.
17. Samejima K, Tone S, Earnshaw WC: CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* 2001, 276(48):45427-45432.
18. Duncan JS, Turowec JP, Vilk G, Li SS, Gloor GB, Litchfield DW: Regulation of cell proliferation and survival: convergence of protein kinases and caspases. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1804(3):505-510.
19. Kitazumi I, Maseki Y, Nomura Y, Shimanuki A, Sugita Y, Tsukahara M: Okadaic acid induces DNA fragmentation via caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways in Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells. *FEBS J* 2010, 277(2):404-412.
20. Jayaraj R, Gupta N, Rao PV: Multiple signal transduction pathways in okadaic acid induced apoptosis in HeLa cells. *Toxicology* 2009, 256(1-2):118-127.
21. Li LY, Luo X, Wang X: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001, 412(6842):95-99.
22. Chen D, Stetler RA, Cao G, Pei W, O'Horo C, Yin XM, Chen J: Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/Inhibitor of caspase-activated DNase (Short form). The endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2000, 275(49):38508-38517.
23. Biddie SC, John S: Minireview: Conversing with chromatin: the language of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 2014, 28(1):3-15.
24. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997, 389(6648):251-260.

25. Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP: A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 1993, 72(1):73-84.
26. Miller KM, Tjeertes JV, Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S, Jackson SP: Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* 2010, 17(9):1144-1151.
27. Tachiwana H, Kagawa W, Shiga T, Osakabe A, Miya Y, Saito K, Hayashi-Takanaka Y, Oda T, Sato M, Park SY et al: Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* 2011, 476(7359):232-235.
28. Gonzalez-Marin C, Gosalvez J, Roy R: Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 2012, 13(11):14026-14052.
29. Conwell CC, Vilfan ID, Hud NV: Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(16):9296-9301.
30. Balhorn R: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of cell biology* 1982, 93(2):298-305.
31. Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, Lewis SE, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L et al: Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Human reproduction* 2010, 25(4):824-838.
32. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM: Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and sterility* 2008, 90(2):352-359.
33. Fraser L: Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Polish journal of veterinary sciences* 2004, 7(4):311-321.
34. Sakkas D, Alvarez JG: Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility* 2010, 93(4):1027-1036.
35. Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Gouraud A, Holt WV: Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev* 2011, 78(12):951-961.
36. 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. *Human reproduction* 2012, 27(10):2908-2917.
37. Smith A, Haaf T: DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence *in situ* end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques* 1998, 25(3):496-502.
38. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N: Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988, 44(1):52-55.
39. Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI: Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Molecular reproduction and development* 1993, 34(1):53-57.
40. Griveau JF, Charbonneau M, Blanchard Y, Lescoat D, Le Lannou D: Decondensation of human sperm nuclei and HP1 protamine degradation from normospermia and asthenospermia in *Xenopus* egg extracts. *Archives of andrology* 1992, 29(2):127-136.
41. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ: Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996, 2(2):103-117.
42. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L: Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis *in vitro*. *Am J Physiol* 1999, 276(2 Pt 1):E310-316.
43. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U: Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999, 4(1):31-37.
44. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE: Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human reproduction* 2004, 19(10):2298-2302.
45. McPherson S, Longo FJ: Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993, 37(2):109-128.
46. McPherson SM, Longo FJ: Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993, 158(1):122-130.
47. Marcon L, Boissonneault G: Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004, 70(4):910-918.
48. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG: Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human reproduction* 2001, 16(9):1912-1921.
49. 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. *Human reproduction* 2005, 20(1):226-230.
50. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE: A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999, 5(9):831-835.
51. Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML: Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Human reproduction* 2005, 20(11):3101-3108.



52. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT: Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005, 129(4):505-514.
53. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP: Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997, 18(3):294-301.
54. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D: Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993, 49(5):1083-1088.
55. Morris ID: Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002, 25(5):255-261.
56. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B: Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Human reproduction* 2008, 23(5):1044-1052.
57. Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD: GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res* 2007, 625(1-2):20-28.
58. de Paula T, Bertolla R, Spaine D, Cunha M, Schor N, Cedenho A: Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril* 2006, 86:597 - 600.
59. Thomson L, Fleming S, Aitken R, De Iuliis G, Zieschang J, Clark A: Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 2009, 24:2061 - 2070.
60. Frainais C, Vialard F, Rougier N, Aegeirther P, Damond F, Ayel J, Yazbeck C, Hazout A, Selva J: Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. *J Assist Reprod Genet* 2010, 27:415 - 421.
61. Kimmins S, Sassone-Corsi P: Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005, 434(7033):583-589.
62. Meyer-Ficca ML, Scherthan H, Burkle A, Meyer RG: Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 2005, 114(1):67-74.
63. Leduc F, Maquennerhan V, Nkoma GB, Boissonneault G: DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 2008, 78(2):324-332.
64. Brugmans L, Kanaar R, Essers J: Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutat Res* 2007, 614(1-2):95-108.
65. Neal JA, Meek K: Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res* 2011, 711(1-2):73-86.
66. Audebert M, Salles B, Calsou P: Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 2004, 279(53):55117-55126.
67. Ahmed EA, de Boer P, Philippens ME, Kal HB, de Rooij DG: Parp1-XRCC1 and the repair of DNA double strand breaks in mouse round spermatids. *Mutat Res* 2010, 683(1-2):84-90.
68. Pandita TK, Richardson C: Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(5):1363-1377.
69. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G: Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008, 36(17):5678-5694.
70. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA: ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 2008, 31(2):167-177.
71. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992, 119(3):493-501.
72. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G: Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human reproduction* 2005, 20(12):3446-3451.
73. Sergerie M, Laforest G, Boulanger K, Bissonnette F, Bleau G: Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Human reproduction* 2005, 20(7):1921-1927.
74. Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1984, 123(1):291-298.
75. 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. *Molecular human reproduction* 1996, 2(8):613-619.
76. Simon L, Carrell DT: Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol* 2013, 927:137-146.
77. Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P: The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive biomedicine online* 2013, 27(4):325-337.
78. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE: Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reproductive biomedicine online* 2013, 26(1):68-78.
79. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM: Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive toxicology* 1991, 5(2):115-125.
80. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR: Thermal denaturation of DNA *in situ* as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975, 90(2):411-428.
81. 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. *Human reproduction* 1999, 14(4):1039-1049.
82. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y: The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online* 2014.
83. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J: Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and sterility* 2007, 87(1):93-100.
84. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P: The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction* 2006, 21(6):1576-1582.
85. 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. *Human reproduction* 2006, 21(11):2876-2881.
86. Frydman N, Prisant N, Hesters L, Frydman R, Tachdjian G, Cohen-Bacrie P, Fanchin R: Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertility and sterility* 2008, 89(1):92-97.
87. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S: The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2000, 79(7):559-563.
88. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP: Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Human reproduction* 2000, 15(8):1717-1722.
89. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE: Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Human reproduction* 2010, 25(7):1594-1608.
90. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG: The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003, 24(1):59-66.
91. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C: Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility* 2005, 84(4):833-842.
92. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Arroyo M, Pacheco A, Gosalvez J: Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of andrology* 2006, 27(1):106-111.
93. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J: Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods in molecular biology* 2011, 682:291-301.
94. Pregl Breznik B, Kovacic B, Vlaisavljevic V: Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and sterility* 2013, 99(5):1233-1241.
95. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997, 56(3):602-607.
96. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF: Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* 1998, 13(3):703-708.
97. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendoijk C, Mehnernt C, Menkveld R, Gips H, Schill W, Kruger T: Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004, 81:965 - 972.
98. Tesarik J, Greco E, Mendoza C: Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004, 19:611 - 615.
99. Nasr-Esfahani M, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M: Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005, 11:198 - 205.
100. Aitken R, Baker M: Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 250:66 - 69.
101. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B: Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. *Journal of reproduction & infertility* 2014, 15(1):2-14.
102. Nallela KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A: Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and sterility* 2006, 85(3):629-634.
103. Haidl G, Allam JP, Schuppe HC: Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 2008, 40(2):92-96.
104. Jequier AM: Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. *Asian journal of andrology* 2010, 12(1):11-13.
105. Aitken RJ: Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010, 12(1):99-103.
106. Andrade-Rocha FT: Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. *Journal of clinical laboratory analysis* 2003, 17(6):247-258.
107. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D: The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2005, 17(3):255-260.
108. Acharyya S, Kanjilal S, Bhattacharyya AK: Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian journal of experimental biology* 2005, 43(11):1016-1022.
109. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D:

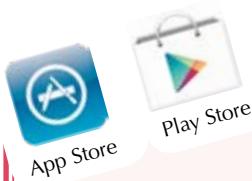


- Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103(25):9601-9606.
110. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF: Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human reproduction* 2001, 16(9):1950-1953.
 111. Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lin DP, Lee MS: DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2004, 21(4):119-126.
 112. Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, De Braekeleer M, Morel F: DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertility and sterility* 2009, 92(2):583-589.
 113. Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S: Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *International journal of andrology* 2010, 33(1):e163-179.
 114. Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP: Measurement and significance of sperm morphology. *Asian journal of andrology* 2011, 13(1):59-68.
 115. Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, Vereecken A, Bosmans E, Steeno O: Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl* 1997, 20(6):367-372.
 116. Xia Y, Cheng S, Bian Q, Xu L, Collins MD, Chang HC, Song L, Liu J, Wang S, Wang X: Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2005, 85(1):615-623.
 117. Karydis S, Asimakopoulos B, Papadopoulos N, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, Nikolettos N: ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. *In vivo* 2005, 19(5):921-925.
 118. Sun F, Ko E, Martin RH: Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2006, 4:1.
 119. Barratt CL, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham SK: Diagnostic tools in male infertility-the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl* 2011, 13(1):53-58.
 120. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S: Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive biomedicine online* 2007, 14(5):650-663.
 121. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA: Globozoospermia revisited. *Human reproduction update* 2007, 13(1):63-75.
 122. Bungum M, Bungum L, Giwercman A: Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian journal of andrology* 2011, 13(1):69-75.
 123. Zenzes MT: Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000, 6(2):122-131.
 124. Perrin J, Tassistro V, Mandon M, Grillo JM, Botta A, Sariminodier I: Tobacco consumption and benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in spermatozoa: in smokers, swim-up procedure selects spermatozoa with decreased DNA damage. *Fertility and sterility* 2011, 95(6):2013-2017.
 125. Hughes EG, Brennan BG: Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity? *Fertility and sterility* 1996, 66(5):679-689.
 126. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J: Smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *American journal of epidemiology* 1996, 143(6):578-587.
 127. Midgette AS, Baron JA: Cigarette smoking and the risk of natural menopause. *Epidemiology* 1990, 1(6):474-480.
 128. Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A: Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 1974, 252(5481):326-328.
 129. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP: Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996, 274(5286):430-432.
 130. Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, 3rd, Jones RT, Osman AL: Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983, 34(5):604-611.
 131. Rosa M, Pacifici R, Altieri I, Pichini S, Ottaviani G, Zuccaro P: How the steady-state cotinine concentration in cigarette smokers is directly related to nicotine intake. *Clin Pharmacol Ther* 1992, 52(3):324-329.
 132. Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F: Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit* 1993, 15(5):358-363.
 133. Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Passa AR, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F: Environmental tobacco smoke: nicotine and cotinine concentration in semen. *Environ Res* 1995, 68(1):69-72.
 134. Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, Griffith JD, McCann M, Everson RB: Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am J Public Health* 1993, 83(9):1335-1338.
 135. Bentley KS, Working PK: Use of seminiferous tubule segments to study stage specificity of unscheduled DNA synthesis in rat spermatogenic cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 1988, 12(3):285-297.
 136. Zenzes MT, Puy LA, Bielecki R, Reed TE: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Molecular human reproduction* 1999, 5(2):125-131.
 137. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P: The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006, 223(1-2):54-60.

138. Niu ZH, Liu JB, Shi TY, Yuan Y, Shi HJ: [Impact of cigarette smoking on human sperm DNA integrity]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* 2010, 16(4):300-304.
139. 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. *Human reproduction* 2002, 17(4):990-998.
140. Evenson D, Wixon R: Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive biomedicine online* 2006, 12(4):466-472.
141. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN: Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertility and sterility* 2008, 89(4):823-831.
142. Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S: DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reproductive biomedicine online* 2007, 14(3):384-395.
143. Li Z, Wang L, Cai J, Huang H: Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2006, 23(9-10):367-376.
144. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N: Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2011, 28(5):391-397.
145. 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. *Human reproduction* 2008, 23(12):2663-2668.
146. 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. *Fertility and sterility* 2004, 82(2):378-383.
147. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egoscue J: Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992, 89(2):181-186.
148. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G: Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertility and sterility* 1993, 60(5):888-892.
149. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ: Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* 1998, 13(7):1864-1871.
150. 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(1):49-55.
151. Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E: Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chemical research in toxicology* 1998, 11(5):441-448.
152. Zang LY, Stone K, Pryor WA: Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free radical biology & medicine* 1995, 19(2):161-167.
153. Santos EP, Lopez-Costa S, Chenlo P, Pugliese MN, Curi S, Ariagno J, Repetto H, Sardi M, Palaoro L, Mendeluk G: Impact of spontaneous smoking cessation on sperm quality: case report. *Andrologia* 2011, 43(6):431-435.
154. Ma E, Chan T, Zhang O, Yang JS, Wang YY, Li YC, Ho R, Lai C, Lam PY: Effectiveness of acupuncture for smoking cessation in a Chinese population. *Asia Pac J Public Health* 2015, 27(2):NP2610-2622.
155. White AR, Ramps H, Liu JP, Stead LF, Campbell J: Acupuncture and related interventions for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2014, 1:CD000009.
156. Jackson R, Bormann C, Hassun P, Rocha A, Motta E, Serafini P, Smith G: Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010, 94:2626 - 2630.
157. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A: Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. *Andrologia* 2011, 43:196 - 202.
158. Jayaraman V, Upadhyay D, Narayan PK, Adiga SK: Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2012, 29(6):557-563.
159. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander H, Thomas AJ, Paesch U: Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006, 74:530 - 537.
160. Hoogendijk C, Kruger T, Bouic P, Henkel R: A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril* 2009, 91:1285 - 1292.
161. Rawe V, Boudri H, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F: Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010, 20:320 - 323.
162. Polak de Fried E, Denaday F: Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertility and sterility* 2010, 94(1):351 e315-358.
163. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F: Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reproductive biomedicine online* 2010, 20(3):320-323.
164. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G: Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and sterility* 2005, 84(6):1665-1673.
165. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M: Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2010, 27(1):13-16.
166. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scavell G, Borini A: Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical



- value in conventional IVF under Italian law. *Reproductive biomedicine online* 2009, 19 Suppl 3:35-43.
167. Sakkas D: Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* 2013, 99(4):1023-1029.
168. Ahmadi A, Ng SC: Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of experimental zoology* 1999, 284(6):696-704.
169. Jaroudi S, Kakourou G, Cawood S, Doshi A, Ranieri DM, Serhal P, Harper JC, SenGupta SB: Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Human reproduction* 2009, 24(10):2649-2655.
170. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS: Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human molecular genetics* 2004, 13(19):2263-2278.
171. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehner C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF: DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive biomedicine online* 2003, 7(4):477-484.
172. Ming L, Yuan C, Ping L, Jie Q: Higher abnormal fertilization, higher cleavage rate, and higher arrested embryos rate were found in conventional IVF than in intracytoplasmic sperm injection. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015, 42(3):372-375.
173. European IVFMC, European Society of Human Reproduction and Embryology, Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, Castilla JA, Calhaz-Jorge C et al: Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 2016, 31(2):233-248.
174. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL: Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update* 2015, 21(6):711-726.



AVISO IMPORTANTE

www.ginecologiadayobstetricia.org.mx

Aquí se consulta la edición más reciente y el acervo de los últimos 10 años. La página web está permitiendo la participación de ginecoobstetras de otros países y continentes y el intercambio de las experiencias de los ginecoobstetras mexicanos.