



## Fragmentación del ADN del espermatozoide y su influencia en la fertilidad de la pareja

Alfredo Góngora Rodríguez,\* Sergio Sánchez González,\*\* Sandra Cubillos García,\*\* Silvio Cuneo Pareto\*\*

### RESUMEN

La fragmentación del ADN del espermatozoide es actualmente una herramienta complementaria importante en reproducción asistida porque con ella se evalúa la calidad del semen de un paciente. Sin embargo, ningún parámetro seminal por sí mismo puede considerarse valor diagnóstico absoluto de infertilidad masculina. El índice de fragmentación del ADN permite inferir datos sobre la capacidad de fertilización del espermatozoide. Diversos estudios han demostrado que en hombres infértiles es mayor el índice de fragmentación de la cromatina de sus espermatozoides, y esto se ha correlacionado directamente con disminución de la calidad embrionaria, la tasa de implantación y el desarrollo a término de un embarazo sano.

**Palabras clave:** fragmentación del ADN del espermatozoide, índice de fragmentación del ADN, cromatina, infertilidad, factor masculino.

### ABSTRACT

The study of DNA fragmentation of the spermatozoa in assisted reproduction is currently considered a complementary tool in the evaluation of the quality of the patient semen. Nevertheless no isolated parameter of sperm study itself is considered an absolute diagnostic value. The DNA fragmentation index (DFI) allows determining fertilization capacity of the spermatozoa. Many studies have demonstrated in infertile males that an elevated DFI index of their spermatozoids correlates directly with a bad embryo quality, low implantation rate and low healthy term-pregnancy rate.

**Key words:** DNA sperm fragmentation, DNA fragmentation index, chromatin, infertility, male factor.

**E**n la actualidad alrededor de 20% de las parejas en edad reproductiva tiene problemas de esterilidad, de ahí que el factor masculino se relacione con la mitad de los casos de infertilidad de una pareja.

La observación anterior hace imperativo que en la valoración de una pareja con dificultades reproductivas se analicen las características del semen.<sup>1</sup> A pesar de la información que proporciona la espermatozoscopia

sobre la calidad seminal de un paciente, es indispensable establecer otras evaluaciones de rutina que proporcionen información precisa del estado fisiológico del espermatozoide, como la determinación del índice de fragmentación de la cromatina, porque se estima que los parámetros seminales de 10 a 15% de los varones estériles están en rangos normales.<sup>2</sup>

El daño al ADN de los espermatozoides se considera una causa importante de infertilidad y de riesgo porque se transmiten defectos genéticos a la descendencia, en especial cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida en las que no es posible realizar una selección que permita excluir células cuyo código genético está dañado. Estudios recientes han demostrado que la tasa de daño al ADN de los espermatozoides de hombres con parámetros seminales normales es alta y que dicho daño se acentúa en condiciones patológicas que conducen a la infertilidad.<sup>3</sup>

La transferencia de la molécula de ADN, desde el espermatozoide hasta el óvulo, es decisiva para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito; por

\* Centro de Fertilidad Humana en México, México, DF.

\*\* CONCIBE, Clínica de Reproducción Asistida, México, DF.

Correspondencia: Dr. Alfredo Góngora Rodríguez. Tuxpan 6-401, colonia Roma Sur, CP 06760, México, DF. Correo electrónico: dr\_gongora@hotmail.com

Recibido: septiembre, 2010. Aceptado: diciembre, 2010.

Este artículo debe citarse como: Góngora-Rodríguez A, Sánchez-González S, Cubillos-García S, Cuneo-Pareto S. Fragmentación del ADN del espermatozoide y su influencia en la fertilidad de la pareja. Rev Mex Reprod 2011;3(3):105-111.

eso, dicha transferencia debe hacerse en forma íntegra e intacta.<sup>4</sup>

## REFERENCIA DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LA FERTILIDAD

### Parejas que pueden someterse a inseminación intrauterina

Los valores altos del índice de fragmentación del ADN reducen, de 16 a 4%<sup>5</sup> o menos, el éxito del ciclo de inseminación intrauterina.<sup>4</sup> Sin embargo, los mismos valores del índice de fragmentación del ADN no influyen en el éxito de los ciclos de fecundación *in vitro* o de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (sobre todo en este último ciclo debido a que es más exitoso),<sup>6,7</sup> porque aun cuando la fragmentación del ADN tenga un efecto negativo en estos ciclos, el efecto queda enmascarado debido a que la selección de los espermatozoides se realiza antes de la fecundación.

### Evaluación de la calidad seminal de pacientes o donantes

Los criterios tradicionales de la Organización Mundial de la Salud y Kruger tienen limitaciones para evaluar la calidad seminal porque con base en sus parámetros hay una superposición de individuos fértiles e infértiles, por lo cual ambas poblaciones no se distinguen.<sup>8,9</sup>

Debido a lo anterior, es de suma relevancia conocer la capacidad del espermatozoide para transmitir el ADN intacto; este estudio, que hasta el momento no se realiza de manera rutinaria,<sup>10</sup> permitiría tener una mayor información para diagnosticar la causa de la infertilidad masculina.<sup>8,9</sup>

La comunidad internacional ha expresado la necesidad de revisar y mejorar los criterios que se utilizan actualmente para evaluar la calidad seminal.<sup>11</sup>

### Revisión de la eficacia de las intervenciones médicas y el tratamiento de enfermedades infecciosas

a) Varicocele: en los pacientes infértiles con varicocele se observa una alta proporción de espermatozoides muy dañados de su ADN.<sup>12</sup> La varicocelectomía reduce significativamente, aunque de manera transitoria, los niveles del índice de fragmentación del ADN.<sup>13</sup> Sin embargo, para evaluar la eficacia de una varicocelec-

tomía las mediciones del índice de fragmentación del ADN después del procedimiento proveen parámetros más cuantificables que la morfología. La medición del índice de fragmentación del ADN le permite al clínico evaluar al paciente y seleccionar a lo largo del tiempo las mejores muestras seminales. b) *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma*: el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN es significativamente mayor cuando hay infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma*.<sup>14</sup> En estos pacientes el tratamiento antibiótico disminuyó los niveles del índice de fragmentación del ADN.<sup>14</sup> Los parámetros seminales restantes no están afectados por las infecciones del aparato genitourinario y la medición del índice de fragmentación del ADN permite a los clínicos evaluar la eficacia del tratamiento antibiótico, así como seleccionar las mejores muestras por utilizar durante el ciclo de reproducción asistida.

### Encontrar explicación a los casos de infertilidad idiopática, fallo de ciclo y abortos de repetición

Altos niveles del índice de fragmentación del ADN influyen en la tasa de fecundación<sup>15</sup> y en la calidad embrionaria,<sup>16</sup> lo cual origina que haya un mayor índice de abortos de repetición<sup>17</sup> y menores tasas de éxito de los ciclos.<sup>13</sup> Los fallos se deben a una baja calidad del ADN del espermatozoide.

Cuando el valor del índice de fragmentación del ADN es mayor de 30%, el clínico debe considerar que existen factores que producen una mayor fragmentación del ADN, como la medicación, los compuestos tóxicos, la fiebre, el tabaco, las drogas, las enfermedades infecciosas, el varicocele, la edad y la abstinencia prolongada.

### CAUSAS DEL DAÑO AL ADN DEL ESPERMATOZOIDE

El daño al ADN del espermatozoide tiene un origen de naturaleza multifactorial. El material genético puede resultar con defectos durante la maduración del espermatozoide por anomalías en la condensación de la cromatina. La integridad de la molécula de ADN asociada con roturas de doble cadena y de cadena sencilla o con anomalías cromosómicas, como pueden ser las aneuploidías o las reordenaciones genómicas estructurales, se relaciona estrechamente con la infertilidad.<sup>4</sup> La

generación de radicales libres de oxígeno<sup>18</sup> y los errores de intercambio, durante la espermatogénesis, entre las protaminas y la fracción de histonas de la cromatina pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino. En relación directa con este tipo de acontecimientos, la apoptosis desempeña –durante el proceso de maduración del espermatozoide– una función importante en la disminución de células con defectos en su cromatina.<sup>19</sup>

Adicionalmente, el daño al ADN del espermatozoide puede incrementarse por administración de fármacos, contaminación atmosférica, tabaquismo, episodios de fiebre alta, temperatura testicular elevada, anomalías anatómicas –como el varicocele– y edad avanzada del individuo.<sup>12,20,21</sup>

### TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DEL ESPERMATOZOIDE

Las metodologías desarrolladas para estudiar la fragmentación del ADN de los espermatozoides pueden dividirse en dos grupos: la primera estrategia incluye las técnicas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado por diversos tratamientos. En este grupo se incluyen la prueba de la estructura de la cromatina espermática (SCSA por sus siglas en inglés),<sup>22-24</sup> la detección de roturas del ADN-hibridación fluorescente *in situ* (DBD-FISH por sus siglas en inglés)<sup>25</sup> y la prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD por sus siglas en inglés)<sup>14</sup> (Cuadro 1). La segunda estrategia incluye las metodologías que marcan las roturas de doble cadena y de cadena sencilla del ADN. En este grupo se incluye el uso de procesos enzimáticos, como el TUNEL (*TdT dUTP nick end labeling*) y la traducción de Nick *in situ* (ISNT por sus siglas en inglés), para incorporar los nucleótidos marcados<sup>26,27</sup> (Cuadro 1).

En las clínicas de infertilidad la prueba de la estructura de la cromatina espermática se utiliza como una herramienta diagnóstica y pronóstica porque es el método más aceptado para medir el índice de fragmentación del ADN. Sin embargo, en un análisis seminal la fragmentación del ADN aún no es un parámetro común debido a la relación costo-efectividad de las diversas metodologías. El requerimiento de equipos especializados y el trabajo extensivo de las técnicas no permiten que en

un laboratorio de andrología la fragmentación del ADN se establezca como un análisis de rutina.

La prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide, que se aplica recientemente y que se encuentra en el mercado como equipo de prueba (Halosperm®), puede usarse fácilmente en el laboratorio de andrología como complemento. La técnica es un ensayo simple y rápido que permite generar información para investigar clínicamente la fragmentación del ADN del espermatozoide.<sup>28</sup> Además, con esta prueba se aprovecha la preservación de la cromatina nuclear para realizar el análisis cromosómico del espermatozoide mediante hibridación fluorescente *in situ*<sup>29</sup> (Figuras 1 y 2).

### FRAGMENTACIÓN Y CALIDAD SEMINAL

En hombres con disfunción espermática es de vital importancia la relación que existe entre una calidad seminal mala y niveles altos de daño al ADN en sus células.

Esta observación tiene una relevancia mínima para la concepción natural, ya que la célula dañada no es hábil para fertilizar al óvulo. Sin embargo, con la implantación de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides las células con niveles altos de fragmentación de su cromatina a menudo son las únicas células disponibles para llevar a cabo la fecundación.

Muchos programas de reproducción asistida utilizan diversos ensayos para evaluar el daño al ADN. Además, han demostrado una correlación negativa entre la fragmentación del ADN del espermatozoide y las tasas de desarrollo embrionario e implantación, así como una correlación positiva importante con el incremento de la tasa de aborto.<sup>30</sup>

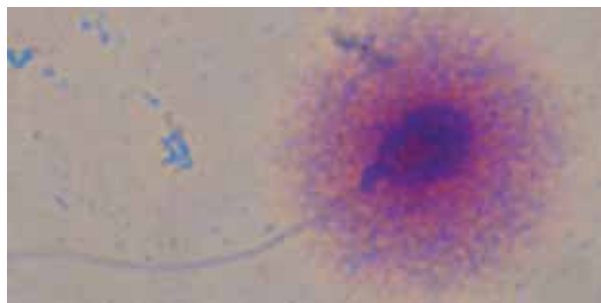
La proporción de espermatozoides con ADN fragmentado parece ser más alta en hombres infértiles que en pacientes control fértiles.<sup>9,31</sup> Además, en individuos con parámetros seminales anormales es más probable encontrar un alto porcentaje de daño en el ADN nuclear del espermatozoide que en hombres con parámetros seminales normales.<sup>31-33</sup>

Estas observaciones indican que los defectos en la cromatina y en la estructura del ADN son parámetros importantes que deben evaluarse en un análisis básico de semen para poder determinar, en un programa de reproducción asistida, el potencial de fertilidad del espermatozoide.

**Cuadro 1.** Metodologías utilizadas para evaluar las alteraciones en el ADN del espermatozoide, así como algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina

| Método | Instrumental                                         | Detalles de la técnica                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TUNEL  | Microscopia de fluorescencia y citometría de flujo   | En los extremos de las roturas existentes de ADN se incorporan nucleótidos marcados con un fluorocromo; la reacción, que se logra con una transferasa terminal, da una señal mayor en fragmentaciones de ADN.                                                                                                                                                                                                      |
| SCSA   | Citometría de flujo                                  | La molécula de ADN se desnaturaliza mediante solución ácida; posteriormente, se marca con naranja de acridina, la cual se intercala entre las dos cadenas de ADN y la cadena sencilla de ADN (desnaturalizado); éste emite diferentes longitudes de onda –verdes y rojas, respectivamente– cuando es excitado. El ADN fragmentado se visualiza en color rojo debido a que es más susceptible de desnaturalización. |
| COMETA | Microscopia de fluorescencia y electroforesis de ADN | En un microgel de agarosa se incluyen espermatozoides; éstos se someten a lisis, y los núcleos desproteinizados, a electroforesis. El ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico y produce una imagen de “cometa”.                                                                                                                                                                                      |
| SCD    | Microscopia de fluorescencia y de campo claro        | Se realiza un tratamiento ácido y de desproteización. Se forman halos de dispersión de la cromatina, que dependen de la formación de bucles de ADN. Si no se generan halos, se considera que el ADN está fragmentado.                                                                                                                                                                                              |

TUNEL: *TDt dUTP nick end labeling*; SCSA: prueba de la estructura de la cromatina espermática; SCD: prueba de dispersión de la cromatina del espermatozoide.

**Figura 1.** Espermatozoide con fragmentación del ADN.**Figura 2.** Espermatozoide normal.

## POTENCIAL DE FERTILIZACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Al parecer, los espermatozoides con integridad dañada de su ADN, independientemente de la severidad del daño, pueden fertilizar al óvulo a la misma tasa que un espermatozoide normal. Varios estudios han mostrado la relación que existe entre el índice de fragmentación del ADN y la fertilidad del espermatozoide después de la inseminación intrauterina, la fecundación *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y han establecido un valor umbral para estas variables en relación con la fertilidad.

Los estudios han demostrado que un valor del índice de fragmentación del ADN superior a 27,<sup>34</sup> 30<sup>24</sup> e –incluso– 40%<sup>35</sup> se relaciona con subfertilidad o infertilidad masculina. Aunque también se ha demostrado que un índice de fragmentación del ADN mayor a 27% es compatible, después de una inseminación intrauterina, fecundación *in vitro* e inyección intracitoplasmática de espermatozoides,<sup>5,36</sup> con un embarazo a término, pero con una probabilidad de éxito más baja.

Las técnicas de reproducción asistida disponibles hacen posible que el espermatozoide pase la barrera natural de fertilización a un grado variable (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Relación entre el índice de fragmentación del ADN y el potencial de fertilización del espermatozoide

| Índice de fragmentación del ADN (%) | Potencial de fertilización |
|-------------------------------------|----------------------------|
| < 15                                | Excelente                  |
| 16-24                               | Alto                       |
| 25-30                               | Bajo                       |
| > 31                                | Muy bajo                   |

Por eso, el índice de fragmentación del ADN se usa como un factor pronóstico independiente de fertilidad masculina.<sup>24,37</sup>

### REPERCUSIÓN DEL DAÑO AL ADN DEL ESPERMATOZOIDE Y RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Las técnicas de reproducción asistida se ven afectadas por el grado de daño que refleje el índice de fragmentación del espermatozoide, ya que el éxito de estas técnicas radica en la integridad estructural y funcional de los gametos.

Se ha sugerido que el efecto paterno en el desarrollo embrionario está mediado por la disfunción del centrosoma o por la deficiencia de factores que activan al óvulo.<sup>38</sup> Este efecto se ha observado, incluso, antes de la activación de la expresión del genoma embrionario, que comienza en la etapa de las cuatro células.<sup>6,39</sup> Asimismo, el efecto paterno tardío puede ser dependiente de aneuploidías cromosómicas, daño al ADN o empaquetamiento anormal de la cromatina, lo cual afecta la activación ordenada de la expresión de los genes paternos.<sup>38</sup>

La estructura normal de la cromatina del espermatozoide es fundamental para una correcta transmisión de la información genética paterna; además, está ampliamente documentado que existe una correlación negativa entre la estructura defectuosa de la cromatina del espermatozoide y la fertilidad *in vivo*<sup>24,35</sup> e *in vitro*.<sup>5,7,22,34,36,40-42</sup>

Además, estos estudios sugieren que el daño al ADN puede servir como un marcador para diagnosticar un efecto paterno adverso en el desarrollo preimplantacional.

Aun cuando 30% de los pacientes que cursan un tratamiento de reproducción asistida tienen tasas altas de daño al ADN,<sup>5</sup> pocas clínicas han establecido de manera rutinaria la evaluación de la integridad del ADN.

### RELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y LA EDAD DEL VARÓN

La edad paterna se ha implicado en el aumento de la frecuencia de abortos espontáneos,<sup>43-46</sup> trastornos autosómicos dominantes, aneuploidías y otras enfermedades.<sup>3,47-55</sup> Aunque todavía se encuentra en estudio la influencia de la edad en la calidad espermática y las tasas de embarazo e implantación, se ha demostrado que hombres mayores de 45 años tienen parámetros seminales anómalos y, con mayor frecuencia, disminución de la movilidad espermática.

Así como el índice de fragmentación del ADN aumenta con la edad, el incremento de daño al ADN predice que el riesgo de conseguir un embarazo anormal con hombres de edad avanzada es elevado.<sup>56</sup>

### REDUCCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DEL ESPERMATOZOIDE CON ANTIOXIDANTES ORALES

La incidencia de la fragmentación del ADN de los espermatozoides eyaculados puede ser reducida con antioxidantes orales.<sup>57-62</sup> Sin embargo, otros reportes cuestionan la utilidad de los antioxidantes en el tratamiento de la infertilidad masculina.<sup>9,63,64</sup> La administración de un gramo diario de vitaminas C y E durante un periodo controlado interfiere el proceso degenerativo de las células, con lo cual no sólo se arregla esta situación, sino que además se observa un descenso en el índice de fragmentación del ADN.<sup>59</sup>

También hay estudios que demuestran que después de dos meses de tratamiento antioxidante oral se reduce significativamente la incidencia de la fragmentación del ADN de los espermatozoides.<sup>13,17</sup> Tales estudios no excluyen la posibilidad de que el tratamiento antioxidante también puede desarrollar células germinales durante el periodo testicular, así como ejercer un efecto benéfico en las células germinales, las células de Sertoli o ambos tipos de células, lo cual propicia una mejor función de los mecanismos de defensa que protegen a las células germinales y espermatozoides contra daños a su ADN.<sup>17,65</sup>



## REFERENCIAS

1. World Health Organization WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4<sup>th</sup> ed, Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
2. Morales R. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2007;24(5).
3. Smith RK. Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptoquidismo. *Rev Médica Chile* 2007;135:279-286.
4. Cortes-Gutierrez, Davila R, Lopez C, Fernandez J, Gonsalvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp* 2007;31(2):120-131.
5. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401-1408.
6. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332:459-461.
7. Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML. Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl* 2005;51:121-124.
8. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: An overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;8:616-627.
9. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331-345.
10. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789-793.
11. Toro E, Fernandez S, Colomar A, Casanovas A, et al. Processing of semen can result in increased sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2009;92(6):2109-2112.
12. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 2006;27(1):106-111.
13. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027-1036.
14. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
15. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, et al. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicoelecomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol* 2010;183(1):270-274.
16. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Weber RF, Dohle GR. Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril* 2009;94(5):1748-1752.
17. Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* 2009;41(4):207-215.
18. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:896-900.
19. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16(10):2160-2165.
20. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005;20(10):2776-2783.
21. Weber RF, Dohle GR, Romijn JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem* 2005;40:317-364.
22. Evenson DP, Jost LK. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. In: Robinson P, editor. *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley & Sons, 2000.
23. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma* 1980;78:225-238.
24. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-1049.
25. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, et al. DNA breakage detection-FISH (DBDFISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 2000;453:77-82.
26. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-205.
27. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52:864-867.
28. Fernández JL, Lourdes M, Goyanes VJ, Segrelles E, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2005;84:833-842.
29. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, et al. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007;28:38-49.
30. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93-105.
31. Ollero M, Gil-Guzmán E, Sharma RK, López MC, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:19129-1921.

32. Irvine S, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;31:33-44.
33. Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D. Sperm nuclear damage in the human. In: Robaire B, Hales BF, editors. *Advances in male mediated developmental toxicity*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003;p:73-84.
34. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-1722.
35. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
36. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409-1417.
37. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75(4):674-677.
38. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:184-189.
39. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999;14:1318-1323.
40. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, et al. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003;80:895-902.
41. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El Tonsy MH, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl. 3):1597-1605.
42. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1289-1295.
43. De La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage: results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 2002;17:1649-1656.
44. Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, et al. Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 108:369-377.
45. Nybo Andersen A, Hansen KD, Andersen P, Davey Smith G. Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2004;160:1214-1222.
46. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, et al. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 2005;161:816-823.
47. Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, et al. The influence of paternal age on Down syndrome. *J Urology* 2003;169:2275-2278.
48. Glaser R, Broman K, Schulman R, Eskenazi B, et al. The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Human Genetics* 2003;73:939-947.
49. Lambert SM, Masson P, Fisch H. The male biological clock. *World J Urology* 2006;224:611-617.
50. Malaspina D, Harlap S, Fennig S, Helman D, et al. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58:361-367.
51. Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, et al. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:1026-1032.
52. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner, Marchetti F, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007;22:180-187.
53. Slotter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* 2004;81:925-943.
54. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *PNAS* 2006;103:9601-9606.
55. Zhang Y, Kreger BE, Dorgan JF, Cupples LA, et al. Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:1208-1212.
56. Vagnini L, Baruffi R, Petersen C, Massaro F, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Rep Biomed Online* 2007;15:514-519.
57. Comhaire FH, Christophe AB, Zalata AA, Dhooge WS, et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63:159-165.
58. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Hum Reprod* 1998;13:1422-1424.
59. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;26:349-353.
60. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003;49:83-94.
61. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68:519-524.
62. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996;17:530-537.
63. Bolle P, Evandri MG, Saso L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 2002;65:313-315.
64. Martin-Du Pan RC, Sakkas D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum Reprod* 1998;13:2984-2985.
65. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009.