

INFERTILIDAD MASCULINA Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO: UN PROBLEMA ACTUAL

Gabriela Alejandra Quintero-Vásquez^{1a},
Rosa María Bermúdez-Cruz^{2b} y Julieta Castillo-Cadena^{1c}

¹Centro de Investigación en Ciencias Médicas, Universidad Autónoma del Estado de México, C.P. 50130, Toluca, México. ²Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN, C.P. 07360, México, D.F.

E-mails: ^agabot_2000@hotmail.com, ^broberm@cinvestav.mx, ^cjcastillo_cadena@hotmail.com

RESUMEN

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia, en la actualidad los parámetros obtenidos a través de un seminograma no dan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo. Es por esto que ha aumentado el interés en desarrollar técnicas encaminadas a evaluar la fragmentación del ADN espermático, ya que en cualquier etapa del proceso de la espermatogénesis se puede producir un daño, siendo éste un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado. Actualmente la infertilidad es un problema global que va en aumento y se ha demostrado que la calidad del ADN del espermatozoide puede afectar la fecundación; es por ello que la evaluación de la integridad del ADN, además del estudio de los parámetros seminales, puede aportar información adicional acerca de la calidad del espermatozoide, y ser de gran ayuda para identificar las causas de la infertilidad masculina y así orientar de mejor manera a las parejas.

Palabras Clave: ADN espermático, calidad del espermatozoide, fragmentación del ADN, infertilidad, semen.

Male infertility and spermatic DNA fragmentation: A current problem

ABSTRACT

Spermatic DNA contributes one half of the genetic material to offspring. Currently, the parameters obtained through a seminogram do not provide complete information on the potential fertilization of the semen and the ability to produce a healthy embryo and an on-going pregnancy. This is the reason why the interest in developing techniques to assess sperm DNA fragmentation has been increased, as damage during spermatogenesis can occur at any stage of the process, this being a multifactorial phenomenon and not entirely delimited yet. Nowadays the infertility is an increasing global problem, and it has been shown that the quality of the DNA in the sperm can affect fertilization; this is why the evaluation of sperm DNA integrity, in addition to the study of the sperm parameters may provide additional information on the quality of the spermatozoa, resulting in great help to identify the causes of male infertility and thus can be used to better guide couples with infertility issues.

Key Words: spermatic DNA, sperm quality, DNA fragmentation, infertility, semen.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema global que va en aumento, afecta tanto a hombres como mujeres y se presenta cuando una pareja con vida sexual regular y sin uso de métodos anticonceptivos intenta por un año quedar embarazada sin éxito o por la imposibilidad de llevar un embarazo a término^{1,2}. Se estima que aproximadamente del 15 al 20% de todas las parejas experimentan infertilidad en algún momento de su vida reproductiva y aproximadamente la mitad de los casos son de origen masculino³.

Los factores que pueden afectar la capacidad reproductiva del varón son: problemas en los espermatozoides, trastornos hormonales, anomalías genéticas, enfermedades e infecciones del sistema reproductor masculino y factores externos como ciertos medicamentos, así como el tabaquismo, el estrés y el consumo de alcohol y otras drogas⁴⁻¹⁰.

En cuanto a los factores relacionados con problemas en los espermatozoides, el análisis del semen o también llamado seminograma o espermatobioscopia directa, es la prueba clínica más importante para diagnosticar la infertilidad masculina^{11,12}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los parámetros básicos que se deben tomar en cuenta para realizar este estudio, el cual incluye tanto un análisis macroscópico que comprende: la licuefacción, apariencia, viscosidad, volumen y pH como un examen microscópico que consta de la movilidad, morfología, vitalidad y concentración espermática^{13,14}. Sin

embargo, este análisis es subjetivo, ya que existe una variación importante de la prueba por su falta de estandarización¹⁵.

Es evidente que el número, la concentración, la movilidad y la normalidad morfológica espermática son factores importantes que determinan el éxito de un embarazo, sin embargo, en muchos casos no permiten detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide que afectan la integridad del genoma masculino¹⁶. Se estima que aproximadamente un 15% de los varones con problemas de infertilidad, presentan parámetros dentro de los rangos normales en el estudio del semen¹⁷⁻¹⁹, sin embargo son casos que podrían deberse entre otras causas, a defectos en la membrana del espermatozoide, a la fragmentación del ADN espermático y a factores ambientales o genéticos, parámetros que no son detectables en el seminograma y que por lo tanto, se tiene que recurrir a técnicas especializadas para su análisis²⁰. El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y se requiere que sea sano para la fertilización, el desarrollo del embrión, el correcto desarrollo fetal y posnatal, de lo contrario un ADN anormal altera cualquiera de éstos procesos²¹.

ADN ESPERMÁTICO

La espermatogénesis es el mecanismo encargado de la producción, crecimiento, maduración y liberación del empaquetamiento del ADN de las células germinales masculinas de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides, este proceso

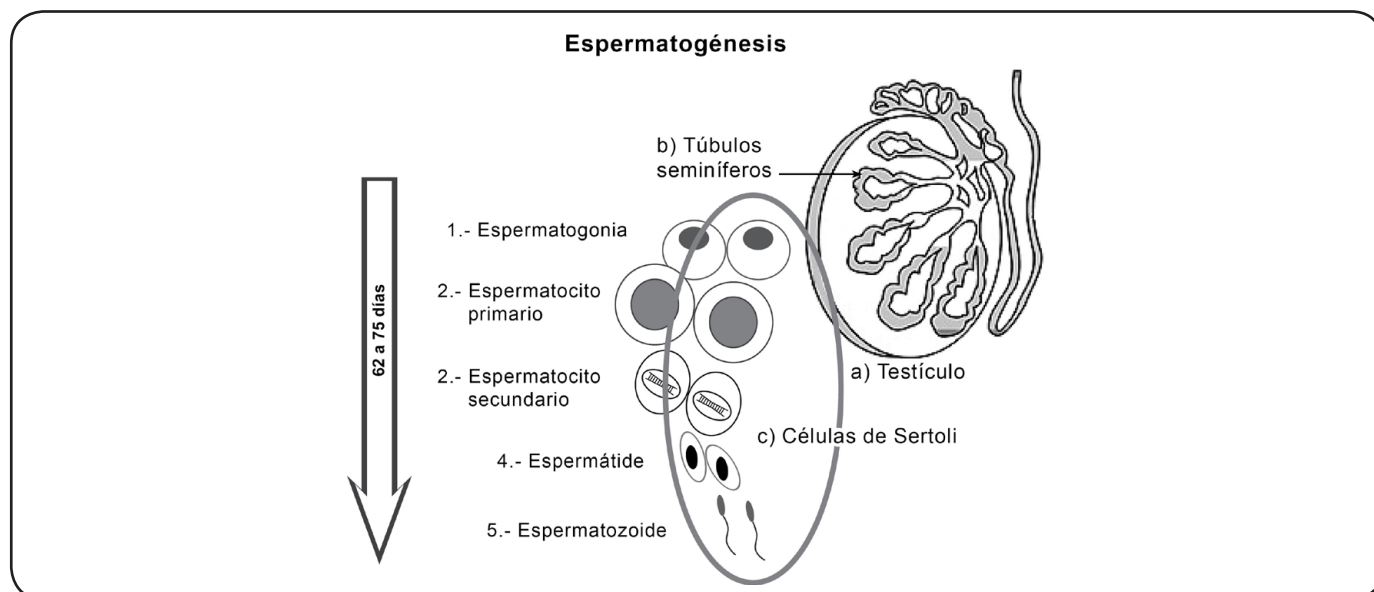


Figura 1. La espermatogénesis se lleva a cabo en los b) túbulos seminíferos ubicados en los a) testículos. c) Células de Sertoli 1) En la fase de proliferación, las espermatogonias se dividen mitóticamente y 2) originan espermatocitos primarios. 3) Durante la meiosis I, el espermatocito primario se divide originando dos espermatocitos secundarios, reduciendo el número cromosómico de diploide a haploide. 4) Durante la meiosis II, el espermatocito secundario se divide originando dos espermátides 5) y finalmente las espermátides mediante un proceso de diferenciación celular dan lugar a los espermatozoides.

se lleva a cabo en los túbulos seminíferos localizados en los testículos. Inicia en la pubertad y tiene una duración aproximada de 62 a 75 días en la especie humana. Consta de tres fases o etapas: la fase proliferativa, donde las espermatogonias, experimentan una serie de divisiones mitóticas y se diferencian en espermátocitos primarios; la fase meiótica, en la cual ocurre la meiosis y la recombinación genética, produciendo la formación de espermátides haploides y la fase llamada espermiogénesis, implicada en el rearreglo de la estructura del citoesqueleto, terminando con las células germinales especializadas llamadas espermatozoides²²⁻²⁴ (Figura 1).

Durante el proceso de la espermatogénesis las histonas somáticas son hiperacetiladas y reemplazadas por las proteínas de transición nuclear (TP1 y TP2) éstas a su vez son reemplazadas por otras proteínas, conocidas como protaminas (P1 y P2)²⁵⁻²⁷. Las protaminas son las proteínas más abundantes en el espermatozoide maduro y empaquetan el genoma paterno dentro del núcleo espermático. Estas proteínas son ricas en arginina y residuos de cisteína; la gran cantidad de arginina provee una fuerte carga positiva facilitando su unión al ADN y garantizando el reemplazo de las histonas y las proteínas de transición nuclear. Los múltiples residuos de cisteína son oxidados para formar puentes disulfuros (S-S) entre las protaminas y estabilizar la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática^{28,29}.

Tanto la P1 como la P2 son necesarias para la condensación adecuada de la cromatina. La alta carga positiva de las protaminas permite la neutralización de la carga negativa del ADN, lo que genera mayor compactación en el núcleo espermático. Esto hace que el ADN del espermatozoide esté seis veces más condensado que el de los cromosomas mitóticos y así el material genético esté protegido durante su travesía a lo largo de los aparatos genitales masculino y femenino. Un defecto en la síntesis de protaminas y en la formación de puentes disulfuro afecta el empaquetamiento de la cromatina, lo que aumenta la vulnerabilidad de los espermatozoides a la fragmentación del ADN³⁰⁻³².

DAÑO AL ADN ESPERMÁTICO

En cualquier etapa del proceso de la espermatogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático, éste es un fenómeno multifactorial y no del todo dilucidado que puede afectar tanto al ADN mitocondrial como al nuclear. Se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino, éstos pueden ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas e incluyen: la generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidativo (incluidos el radical hidroxil y óxido nítrico durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo), el empaquetamiento anormal de la cromatina (errores en la sustitución de histonas por protaminas en el proceso de espermiogénesis), deficiencias en la recombinación,

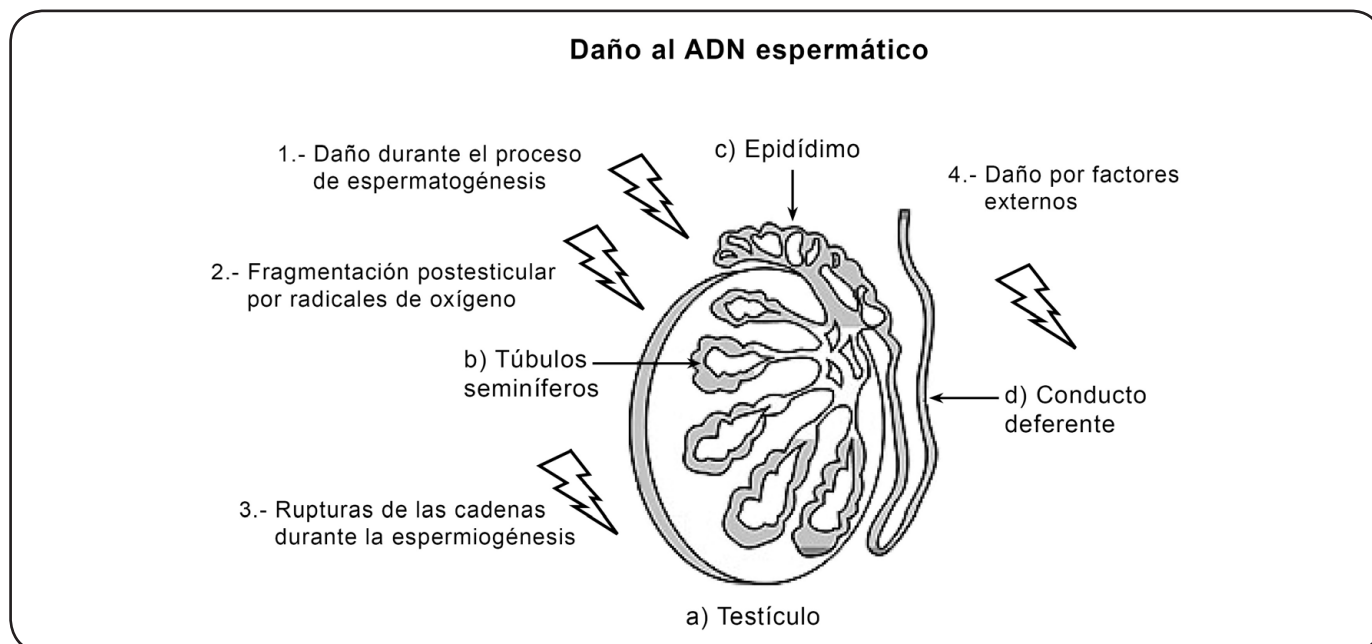


Figura 2. Daño al ADN espermático. El daño al ADN en los espermatozoides puede ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas e incluye: 1) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis; 2) fragmentación posttesticular del ADN inducida principalmente por radicales de oxígeno (incluidos el radical hidroxil y óxido nítrico) durante el transporte espermático a través de los túbulos seminíferos y el epidídimo 3) fragmentación en las cadenas de ADN producidas durante la remodelación de la cromatina espermática y durante el proceso de espermiogénesis; 4) daño al ADN inducido por tóxicos ambientales y factores externos.

apoptosis en el proceso de espermatogénesis tras la salida del espermatozoide a los túbulos y causas externas que pueden provocar o potenciar los efectos anteriores dentro de los que se consideran determinadas condiciones ambientales como la contaminación, el tabaquismo, la temperatura testicular elevada o patológicas como la criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infección del tracto genital, cáncer, episodios febriles y estrés, entre otras³³⁻³⁹ (Figura 2). Estas alteraciones en el material genético del espermatozoide pueden incluir anomalías en la condensación de la cromatina y en la integridad de la molécula del ADN cuando presenta rupturas tanto de doble como de simple cadena y también anomalías cromosómicas, demostradas por una correlación entre las alteraciones en la organización del material genómico del ADN y su potencial de fertilización; enfatizando el hecho de que la estabilidad del ADN espermático es un criterio a tener en cuenta para considerar si un espermatozoide podría ser fértil o no⁴⁰⁻⁴².

En los últimos años se ha considerado como causa probable de infertilidad el daño al ADN espermático y de ahí ha aumentado el interés en desarrollar técnicas encaminadas a evaluar la fragmentación. Existen diferentes estrategias para estudiar la fragmentación del ADN espermático. Por un lado se encuentran las metodologías encaminadas a detectar las rupturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble que se registran de forma natural o fortuita en la molécula del ADN, como es la metodología del Túnel o Ensayo *in situ* nick translation (NT) que incorpora moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos rotos del ADN. Por otro lado, tenemos las estrategias de estudio de la fragmentación que se basan en medir la capacidad de la cromatina y en particular del ADN para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se encuentran: Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), dispersión de la cromatina espermática (SCD) y ensayo cometa⁴³⁻⁴⁶.

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EVALUAR EL ADN ESPERMÁTICO

Ensayo de Túnel

El ensayo de TÚNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling), permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos del ADN que quedan libres a causa de las rupturas de éste, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora desoxiuridina, modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. El nucleótido incorporado está directamente marcado con un fluorocromo. Esta técnica ha tenido muy buena aceptación dado que es versátil, está comercialmente disponible y los resultados pueden ser interpretados fácilmente. La señal es mayor cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN. Esta técnica fue desarrollada para identificar una población apoptótica de espermatozoides en el eyaculado, sin embargo la fragmentación del ADN medida mediante el TÚNEL no está siempre asociada con un fenómeno apoptótico, ya que podría deberse a una

maduración espermática defectuosa por un empaquetamiento incorrecto de la cromatina⁴⁷⁻⁴⁹.

ENSAYO *IN SITU* NICK TRANSLATION

El análisis de *in situ* nick translation (ISNT) cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridín trifosfato) biotinilado en las rupturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo NT detecta a los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN, estos resultados indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. El estudio de la integridad nuclear espermática mediante el análisis NT evidencia una buena correlación con la movilidad y la morfología espermática, y en menor medida con la concentración de espermatozoides en el semen^{50,51}.

Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo, para cuantificar daño en el ADN de células individuales. En esta técnica las células son colocadas en gel de agarosa en un portaobjeto y sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfidrilo de las protaminas que permite que el ADN fragmentado pueda migrar en un proceso de electroforesis durante un corto tiempo. Para visualizar el ADN que se separó de la célula, éste es teñido con sustancias fluorescentes como DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), Ioduro de Propidio o SYBR-GREEN (Synergy Brand). Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo, generando una imagen similar a la cola de un cometa. La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola, que a su vez pueden utilizarse también otros parámetros de medida, como el "momento de la cola", que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción total del ADN de la cola). La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de poder detectar fragmentación de simple o doble cadena del ADN espermático en una sola célula^{46,52,53}.

Ensayo de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA)

Es una técnica que desnaturaliza la molécula de ADN mediante una solución ácida o mediante un tratamiento con calor y una vez desnaturalizada se tiñe con naranja de acridina. Este fluorocromo se intercala entre las dos cadenas de ADN y al ser excitado emite una longitud de onda de 530 nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (ADN desnaturalizado) emite una longitud de onda de 640 nm de color rojo. Las células se separan y leen por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado y por tanto se visualiza en color rojo⁵⁴⁻⁵⁷.

Dispersión de la cromatina espermática (SCD)

Esta técnica consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que

Método	Ventajas	Desventajas	(% SDF)	Relación en el seminograma
TÚNEL	Cumple con parámetros de control de calidad.	Equipos sofisticados y costosos (Citometría de flujo y microscopía de fluorescencia) Capacitación técnica No se ha establecido punto de corte entre fértiles e infértiles	Daris <i>et al.</i> ⁶⁷ (2010) ICSI (FR 65.6% con SDF ≤20%, 54.9% con SDF < 20%) n=20 Frydman <i>et al.</i> ⁶⁸ (2008) IVF (FR 69.9% con 35%, 71.7% con SDF ≥35%), CP (62.5% con SDF <35%; 37.5% con SDF ≥35%), IR (42.4% con SDF <35%; 24.5% con SDF ≥35%), PL (10% con SDF <35%; 36.8% con SDF ≥35%), n=117	Se ha demostrado una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado, la motilidad, la concentración y los parámetros morfológicos relacionados con formas anormales.
ISNT	Reacción de marcaje directo			
SCSA	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar entre pacientes fértiles e infértiles)	Equipo sofisticado y costoso (Citometría de flujo) Capacitación técnica	Kennedy <i>et al.</i> ⁶⁹ (2011) IVF/ICSI (NV (r=0.42, P=0.01); (NE r=0.47, p=0.01), n=233; (PL p<0.001) Lin <i>et al.</i> ⁷⁰ (2008) IVF (FR 82 % con SDF < 9%; 84.87% con SDF = 9% - 27%; 84.74% con SDF <27%); ER (55.2% con SDF 9%; 58.67% con SDF = 9% - 27%; 55.03% con SDF >27%) n=137	El índice de fragmentación del ADN, presenta una débil correlación con los criterios clásicos de calidad espermática.
COMETA	Bajo costo	Equipo sofisticado y costoso (Citometría de flujo) Capacitación técnica. Requiere observador con experiencia.	Simon <i>et al.</i> ⁷¹ (2011) IVF FR (r ² = 0.243, P=0.050 en semen; r ² = 0.276, P=0.050 en semen seleccionado); calidad del embrión (r ² = -0.0415, P=0.002 en semen; r ² = -0.373, P=0.007 en semen seleccionado) n=75 Lewis <i>et al.</i> ⁷² (2004) ICSI No hubo relación significativa entre SDF y FR, n=77	Se ha observado una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y los criterios clásicos de calidad espermática.
SCD	Análisis simple de resultados. Bajo costo	Lento de ejecución.	Payne <i>et al.</i> ⁷³ (2005) DFI= 27%. El DFI se correlacionó negativamente con la densidad de espermatozoides (r = -0.23; p <0.03) y la motilidad (r = -0.55; p <0.00) n=100	Se determinó un incremento en el daño al ADN espermático en pacientes con oligoastenoteratozoospermia.
TÚNEL:	Terminal dUTP Nick-End Labeling. ISNT = <i>In situ</i> Nick Translation. SCSA: Estructura cromatínica del espermatozoide SCD: Dispersión de la cromatina espermática CP, embarazo clínico; ER, pérdida del embrión; FR, tasa de fertilización; ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides; IVF, fertilización <i>in vitro</i> ; NV, nacidos vivos; SDF, fragmentación de ADN espermático; DFI, índice de fragmentación del ADN.			

Tabla I. Ventajas e inconvenientes de las metodologías utilizadas para evaluar la fragmentación del ADN de los espermatozoides, relación de fragmentación espermática de otros autores en distintas técnicas de reproducción y la relación con el seminograma.

tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desprotección, de forma que los espermatozoides con fragmentación no generan un halo de dispersión de la cromatina. Por el contrario, los que no están fragmentados dan lugar a grandes halos de dispersión. Se valora el tamaño de los halos de dispersión mediante microscopía de campo claro o de fluorescencia. Es posible reconocer la presencia de fragmentación del ADN de la siguiente forma: cabezas de espermatozoides con halos grandes o medianos significan que no hay daño en el ADN espermático, mientras que aquellos con halos pequeños o sin ellos sugieren un daño en el ADN^{74,58-60}.

VALOR PREDICTIVO DE LAS PRUEBAS PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

El valor predictivo de las pruebas de fragmentación del ADN espermático en una pareja con infertilidad depende de una serie de factores, entre los que se incluyen: el tipo de daño al ADN ya sea daño de cadena sencilla o doble, el porcentaje de espermatozoides con daño en el ADN, la extensión del daño, si existe daño combinado de nucleótidos y fragmentación, si el daño afecta intrones o exones, el tipo de prueba de fragmentación del ADN utilizado y la capacidad del ovocito de reparar el daño al ADN espermático⁶¹⁻⁶³ (Tabla I).

Diversos estudios han demostrado que la expresión genética del embrión y del ovocito están equipados con mecanismos para hacer frente a algunas anomalías en el ADN paterno, sin embargo, la capacidad del ovocito de iniciar la reparación depende, en gran medida, de su calidad citoplásmica y genómica. Por ejemplo, se sugiere que la fragmentación de doble cadena es aquella “no reparable” por el ovocito, mientras que la simple podría llegar a ser reparada por un ovocito sano y joven⁶⁴⁻⁶⁶.

INFERTILIDAD Y CALIDAD EN LOS ESPERMATOZOIDES

Los parámetros obtenidos a través de un seminograma no aportan una información completa sobre el potencial fecundante del semen y la capacidad de dar lugar a un embrión sano y un embarazo evolutivo⁷⁴. Cuando un espermatozoide con un daño severo en su ADN fecunda un ovocito el embrión puede alterarse en su desarrollo o implantarse en el útero y provocar un aborto espontáneo en un estadio más tardío. De igual manera, cuando un espermatozoide con un mínimo de daño en su ADN es utilizado, el desarrollo fetal puede verse afectado tardíamente y puede dar lugar a un niño con anomalías^{75, 76}.

Existe una población de hombres con problemas reproductivos que muestran características de concentración, movilidad y morfología normales; indicando que los parámetros seminales no son del todo indicativos de la calidad espermática⁷⁷. Por otro lado parámetros seminales alterados están en estrecha asociación con la presencia de daño en el ADN del espermatozoide y la calidad del semen. Confirmando que diversas alteraciones en las características del espermatozoide se asocian con un aumento

en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado, situación que ha merecido la atención en los últimos años. Demostrando que un incremento de la fragmentación está relacionado con una disminución de la concentración espermática, la motilidad y la morfología y por consiguiente con posibles problemas reproductivos⁷⁸⁻⁸⁰.

Las circunstancias cambiantes obligan al desarrollo de procedimientos alternativos que permitan evaluar la calidad espermática, como el estudio del daño del ADN espermático, procedimiento que adquiere una mayor relevancia y que muestra una significativa correlación entre el daño y el índice de fertilidad, con repercusiones en la tasa de fertilización, la tasa de división del embrión, la tasa de implantación, el índice de embarazos y el índice de natalidad⁸¹⁻⁸⁴.

En conclusión, es importante el poder protocolizar de manera sistemática el estudio cromosómico de espermatozoides en los laboratorios clínicos, como complemento de otros estudios y poder evidenciar un daño al ADN genómico, ya que estos resultados pueden ser de gran ayuda al médico para identificar las causas de la infertilidad masculina y orientar de mejor manera a las parejas para lograr un embarazo a término⁸⁵⁻⁸⁷.

REFERENCIAS

1. WHO Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principle. *World Health Organization* (1990).
2. Nallella, K.P., Sharma, R.K., Aziz, N. & Agarwal, A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* **85**, 629-634 (2006).
3. Spira, A. & Multigner, L. Sperm density and environment. *Treatment of infertility: the new frontiers* (1998).
4. Alshahrani, S. *et al.* Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **12**, 103 (2014).
5. Enciso, M., Alfarawati, S. & Wells, D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum. Reprod.* **28**, 1707-1715 (2013).
6. Gallegos, G. *et al.* Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril* **90**, 328-334 (2008).
7. Li, W.W. *et al.* Cigarette smoking affects sperm plasma membrane integrity. *Zhonghua Nan Ke Xue* **18**, 1093-1096 (2013).
8. Martini, A.C. *et al.* Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertil Steril* **82**, 374-377 (2004).
9. Sánchez-Peña, L.C. *et al.* Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **196**, 108-113 (2004).
10. Schmid, T.E. *et al.* Elemental composition of human semen is associated with motility and genomic sperm defects among older men. *Hum. Reprod.* **28**, 274-282 (2013).
11. Menkveld, R. The basic semen analysis. Chapter 9. In: *Male Infertility. Diagnosis and treatment* (eds. Oehninger, S. & Kruger, T.F.) 141-170 (Oxon, UK, Informa Healthcare, 2007).
12. McLachlan, R.I. *et al.* Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology* **35**, 25-33 (2003).

13. WHO Laboratory Manual for the examination and Processing of Human Semen. *World Health Organization press* **5th edn** (2010).
14. Comhaire, F. & Vermeulen, L. Human semen analysis. *Hum Reprod Update* **1**, 343-362 (1995).
15. Cocuzza, M. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int. Braz. J. Urol.* **41**, 181-183 (2010).
16. Barratt, C.L., Bjorndahl, L., Menkveld, R. & Mortimer, D. Special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum. Reprod.* **26**, 3207-3212 (2011).
17. Guzick, D.S. *et al.* Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil. Steril.* **70**, 207-213 (1998).
18. Carrell, D.T. *et al.* Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.* **49**, 49-55 (2003).
19. Khadem, N., Poorhoseyni, A., Jalali, M., Akbary, A. & Heydari, S.T. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* **46**, 126-130 (2014).
20. Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T. & Minarik, G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol. Proced. Online* **15**, 5 (2013).
21. Irvine, D.S. *et al.* DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.* **21**, 33-44 (2000).
22. De Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* **13 Suppl 1**, 1-8 (1998).
23. Rajender, S., Avery, K. & Agarwal, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat. Res.* **727**, 62-71 (2011).
24. Tesarik, J., Guido, M., Mendoza, C. & Greco, E. Human spermatogenesis *in vitro*: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 4467-4473 (1998).
25. Aoki, V.W. *et al.* DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J. Androl.* **26**, 741-748 (2005).
26. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227 (2007).
27. Carrell, D.T., Emery, B.R. & Hammoud, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update* **13**, 313-327 (2007).
28. Iranpour, F.G. The effects of protamine deficiency on ultrastructure of human sperm nucleus. *Adv. Biomed. Res.* **3**, 24 (2014).
29. Jodar, M. & Oliva, R. Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv. Exp. Med. Biol.* **791**, 83-102 (2013).
30. Liu, L., Aston, K.I. & Carrell, D.T. Protamine extraction and analysis of human sperm protamine 1/protamine 2 ratio using Acid gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **927**, 445-450.
31. Hekmatdoost, A., Lakpour, N. & Sadeghi, M.R. Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **1**, 147-160 (2009).
32. Agarwal, A. & Said, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update* **9**, 331-345 (2003).
33. Yu, B. *et al.* Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil Steril* **101**, 51-57 (2013).
34. Agarwal, A. & Saleh, R.A. Utility of oxidative stress test in the male infertility clinic *Zhonghua Nan Ke Xue* **8**, 1-9 (2002).
35. Oliva, A., S.A. & Multigner, L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum. Reprod.* **16** 1768-1776 (2011).
36. Godmann, M., Lambrot, R. & Kimmins, S. The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc. Res. Tech.* **72**, 603-619 (2009).
37. Agarwal, S., Sikka, M., Dev, G. & Banerjee, A. Testicular size, morphology and spermatogenesis in infertile males with varicocele. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **31**, 19-25 (1988).
38. Wright, C., Milne, S. & Leeson, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod. Biomed. Online* **28**, 684-703 (2014).
39. Aitken, R.J. & Krausz, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* **122**, 497-506 (2001).
40. Agarwal, A. & Allamaneni, S.S. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* **84**, 850-853 (2005).
41. Koskimies, A.I., Savander, M., Ann-Marie, N. & Kurunmaki, H. Sperm DNA damage and male infertility. *Duodecim.* **126**, 2837-2842 (2011).
42. Zini, A., Bielecki, R., Phang, D. & Zenzes, M.T. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* **75**, 674-677 (2001).
43. Zhang, X.D. *et al.* The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Hum. Fertil (Camb.)* **14**, 187-191 (2011).
44. Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Domínguez-Rebolledo, A.E., Estes, M.C. & Garde, J.J. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 424-431 (2009).
45. Ribas-Maynou, J. *et al.* Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* **1**, 715-722 (2013).
46. Durmaz, A. *et al.* COMET, TUNEL, and TEM analysis of an infertile male with short tail sperm. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* **16**, 54-57 (2015).
47. Chenlo, P.H. *et al.* Fragmentation of sperm DNA using the TUNEL method. *Actas Urol. Esp.* **38**, 608-612 (2014).
48. Curi, S.M. *et al.* Flow cytometry TUNEL standardization for assaying sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* **33**, 1 (2011).
49. Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Balleca, J.L. & Oliva, R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A.* **71**, 1011-1018 (2007).
50. Chesselet, M.F., MacKenzie, L. & Hoang, T. Detection of DNA damage in tissue sections by in situ nick translation. *Curr. Protoc. Neurosci.* **Chapter 1**, Unit 19 (2001).
51. Gorczyca, W., Gong, J. & Darzynkiewicz, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* **53**, 1945-1951 (1993).

52. Aravindan, G.R., Bjordahl, J., Jost, L.K. & Evenson, D.P. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp. Cell Res.* **236**, 231-237 (1997).
53. Fairbairn, D.W., Olive, P.L. & O'Neill, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* **339**, 37-59 (1995).
54. Bungum, M., Bungum, L. & Giwercman, A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J. Androl.* **13**, 69-75 (2011).
55. Evenson, D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA). *Methods Mol. Biol.* **927**, 147-164 (2012).
56. Evenson, D.P. & Wixon, R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril* **84**, 846-849 (2005).
57. Henkel, R., Hoogendijk, C.F., Bouic, P.J. & Kruger, T.F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* **42**, 305-313 (2010).
58. Fernández, J.L. *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* **84**, 833-842 (2005).
59. Fernández, J.L. *et al.* The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* **24**, 59-66 (2003).
60. Muriel, L. *et al.* Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J. Androl.* **28**, 38-49 (2007).
61. Ahmadi, A. & Ng, S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **284**, 696-704 (1999).
62. Ahmadi, A. & Ng, S.C. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum. Reprod.* **14**, 2279-2285 (1999).
63. Spano, M., Seli, E., Bizzaro, D., Manicardi, G.C. & Sakkas, D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **17**, 255-260 (2005).
64. Wossidlo, M. *et al.* Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO. J.* **29**, 1877-1888 (2010).
65. Enciso, M. *et al.* The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian J. Androl.* **13**, 764-768 (2011).
66. Derijck, A., van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M. & de Boer, P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1922-1937 (2008).
67. Daris, B., Goropevsek, A., Hojnik, N. & Vlasisavljevic, V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch. Gynecol. Obstet.* **281**, 363-367 (2009).
68. Frydman, N. *et al.* Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* **89**, 92-97 (2008).
69. Kennedy, C., Ahlering, P., Rodríguez, H., Levy, S. & Sutovsky, P. Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* **22**, 272-276 (2011).
70. Lin, M.H. *et al.* 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. *Fertil Steril* **90**, 352-359 (2008).
71. Simon, L., Lutton, D., McManus, J. & Lewis, S.E. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and *in vitro* fertilization success. *Fertil Steril* **95**, 652-657 (2010).
72. Lewis, S.E., O'Connell, M., Stevenson, M., Thompson-Cree, L. & McClure, N. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum. Reprod.* **19**, 1385-1394 (2004).
73. Payne, J.F. *et al.* Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* **84**, 356-364 (2005).
74. Fujimoto, V.Y., Browne, R.W., Bloom, M.S., Sakkas, D. & Alikani, M. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertil Steril* **95**, 1197-1204.
75. Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P.L. & Scaruffi, P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum. Reprod.* **28**, 2652-2660 (2013).
76. Pregl Breznik, B., Kovacic, B. & Vlasisavljevic, V. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* **99**, 1233-1241 (2013).
77. Sakkas, D. *et al.* Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* **4**, 31-37 (1999).
78. Muratori, M. *et al.* Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol. Med.* (2015).
79. Pan, F. *et al.* Seminal parameters at different times of reanalysis of the normal semen samples detected in initial examination and their correlation with sperm DNA damage. *Zhonghua Nan Ke Xue* **19**, 63-67 (2013).
80. Shaman, J.A., Yamauchi, Y. & Ward, W.S. Sperm DNA fragmentation: awakening the sleeping genome. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 626-628 (2007).
81. Lewis, S.E., Agbaje, I. & Álvarez, J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **54**, 111-125 (2008).
82. Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., Meriano, J. & Casper, R.F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **69**, 528-532 (1998).
83. Sun, J.G., Jurisicova, A. & Casper, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* **56**, 602-607 (1997).
84. Huang, C.C. *et al.* Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* **84**, 130-140 (2005).
85. Drobnis, E.Z. & Johnson, M.H. Are we ready to incorporate sperm DNA-fragmentation testing into our male infertility work-up? A plea for more robust studies. *Reprod. Biomed.* **30**, 111-112 (2015).
86. Evgeni, E., Charalabopoulos, K. & Asimakopoulos, B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J. Reprod. Infertil* **15**, 2-14 (2014).
87. Zini, A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst. Biol. Reprod. Med.* **57**, 78-85 (2011).