

# Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina

A. Agarwal y S. S.R. Allamaneni

*Center for Advanced Research in Human Reproduction, Infertility and Sexual Function, Glickman Urological Institute and Department of Obstetrics and Gynecology, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio, Estados Unidos.*

## RESUMEN

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y se requiere para la fertilización, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y posnatal. Un ADN anormal puede conducir a alteraciones en cualesquiera de estos procesos. El ADN del espermatozoide es normalmente resistente a diversos tipos de agentes. En varios estudios recientes se plantea la posibilidad de que, en la actualidad, la fertilidad masculina esté disminuyendo debido a anomalías genómicas. En diversos artículos se describe un incremento de las anomalías congénitas y del cáncer testicular en niños.

Las alteraciones en el material genético pueden incluir tanto una condensación nuclear como roturas en el ADN y aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide. Recientemente, la integridad del ADN del espermatozoide se está reconociendo como una medida independiente de su calidad. Se ha demostrado que la calidad del ADN del espermatozoide puede afectar la fertilidad *in vivo* e *in vitro*. La causa de la infertilidad en varones estériles con parámetros seminales normales se podía relacionar con la presencia de un ADN anormal en el espermatozoide. La evaluación de la integridad del ADN en el espermatozoide, además del estudio de los parámetros sistemáticos seminales, podría aportar una información adicional acerca de la calidad de espermatozoide. Esto puede resultar de ayuda para identificar las causas de la esterilidad masculina y a la hora orientar a las parejas infértiles.

**Palabras clave:** Infertilidad masculina. ADN del espermatozoide. Cromatina del espermatozoide. Evaluación de la infertilidad.

## Sperm chromatin defects in the etiopathogenesis of male infertility

Sperm DNA is known to contribute one half of the genomic material to offspring. Normal sperm genetic material is required for fertilization, embryo and fetal development and adequate postnatal development. Abnormal DNA can lead to derangements in any of these processes. Sperm DNA is normally resistant to many types of insult. Recent reports have raised concern about decreasing male fertility caused by genomic abnormalities. Several reports describe increased congenital anomalies and testicular cancer in children.

Defects in the genomic material may take the form of condensation or nuclear maturity defects, DNA breaks or DNA integrity defects and sperm chromosomal aneuploidy. Recently, sperm DNA has been recognized as an independent measure of sperm quality. The quality of sperm DNA has been shown to affect fertility both *in vivo* and *in vitro*. The cause of infertility in infertile men with normal semen parameters could be related to abnormal sperm DNA. The evaluation of sperm DNA integrity, in addition to routine sperm parameters, could add further information on the quality of spermatozoa. This could help in the correct identification of male infertility and in advising couples on the management of infertility.

**Key words:** Male infertility. Spermatozoa DNA. Sperm chromatin. Infertility evaluation.

## INTRODUCCIÓN

La esterilidad afecta a un 15-20% de las parejas y en aproximadamente la mitad de los casos el defecto es de origen masculino. Aunque se han realizado enor-

mes progresos en la comprensión de la fisiología del espermatozoide y de los mecanismos de su interacción con el óvulo, todavía queda por aclarar qué pruebas sirven para predecir de forma exacta el funcionamiento del espermatozoide.

El análisis del semen sigue siendo la prueba clínica de laboratorio más importante de que se dispone para la evaluación del factor masculino. Es evidente que el número y la concentración de los espermatozoides, su movilidad y su normalidad morfológica son factores importantes que determinan el éxito en la consecución de un embarazo, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>1</sup>.

**Correspondencia:** Ashok Agarwal, PhD, HCLD, Director, Center for Advanced Research in Human, Reproduction, Infertility, and Sexual Function, Glickman Urological Institute and Department of Obstetrics-Gynecology, The Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Desk A19.1, Cleveland, OH 44195, Estados Unidos.  
Correo electrónico: agarvaa@ccf.org  
Web: <http://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter>  
Traducción y adaptación científica de los Dres. JLI. Ballecà y R. Oliva.

Aunque el análisis del semen constituye un pilar esencial para la evaluación de la esterilidad, en muchos casos no permite detectar la presencia de alteraciones sutiles en el espermatozoide. Se considera que aproximadamente un 15% de los varones estériles presenta un espermiograma dentro la más completa normalidad<sup>2</sup>.

Es posible que los parámetros sistemáticos del semen no siempre sean indicativos de la calidad de la ADN del espermatozoide. Los pacientes pueden tener espermiogramas normales y seguir siendo estériles. La causa de la infertilidad puede ser debida a la presencia de un ADN anómalo espermático, factor que no se mide de forma sistemática. La integridad del ADN en el espermatozoide se puede considerar como un parámetro independiente e indicativo de la calidad de éste.

La importancia de la cromatina del espermatozoide se pone más de manifiesto cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida en parejas estériles. La principal desventaja de estas técnicas es que constituyen una forma de evitar la barrera de selección natural que ocurre de forma normal en los tractos reproductivos masculino y femenino, desde la eyaculación hasta que el espermatozoide penetra el óvulo. La naturaleza proporciona de forma natural múltiples obstáculos, de forma que sólo el espermatozoide más apto llega a alcanzar y a fecundar el óvulo. Los espermatozoides genéticamente dañados pueden ser capaces de fertilizar cuando se inyectan de manera directa dentro del oocito<sup>3</sup>. Si el ADN del espermatozoide presenta lesiones, puede dar lugar a un desarrollo anómalo embrionario, a un fallo de implantación o incluso a un aborto en fases más tardías. Cuando el daño del ADN espermático es compatible con vida, puede dar lugar a un niño con diversas anomalías. La determinación de los parámetros sistemáticos del semen no aporta información acerca de la calidad del espermatozoide, especialmente en las técnicas de reproducción asistida. Así pues, puede resultar prudente determinar si hay daño en el ADN de pacientes estériles, especialmente en los casos en los que los parámetros sistemáticos no hayan evidenciado ninguna anomalía obvia y previamente a la utilización de cualquier técnica de reproducción asistida.

### **LESIONES DEL ADN Y PARÁMETROS SEMINALES SISTEMÁTICOS**

La calidad del espermatozoide evaluada mediante los parámetros convencionales seminales (concentración, motilidad, y morfología) se correlaciona con la integridad del ADN<sup>4-6</sup>. En algunos pacientes estériles, el

control de la espermatogénesis puede ser menos eficiente y se pueden producir numerosos espermatozoides inmaduros con restos citoplasmáticos, que son más propensos a producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y que se caracterizan por la presencia de anomalías en el ADN<sup>7,8</sup>. Irvine et al<sup>9</sup> describieron una correlación negativa entre la presencia de daño en el ADN del espermatozoide y la calidad del semen<sup>9</sup>. En otros estudios se ha confirmado que diversas alteraciones en las características del espermatozoide se asocian con un aumento en la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado<sup>10,11</sup>.

### **MECANISMOS DE LESIÓN EN EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE**

Normalmente, el ADN del espermatozoide es muy estable gracias a su organización característica<sup>12</sup>. El origen de la producción de lesiones en el ADN del espermatozoide puede deberse a múltiples causas, como la presencia de una enfermedad, el uso de fármacos, la presencia de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, la contaminación atmosférica, el tabaquismo o una edad avanzada. Se han propuesto diversas hipótesis acerca del mecanismo molecular a través del cual se produce el daño en el ADN del espermatozoide. El mecanismo más importante de producción del daño en el ADN del espermatozoide puede ser la presencia de un empaquetamiento anómalo de la cromatina, debido a una protaminación insuficiente, y a la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y apoptosis<sup>13,14</sup>. La presencia de radicales libres de oxígeno ha merecido una atención especial, tanto por su papel en la fisiología como por su implicación en las enfermedades de la reproducción humana<sup>15</sup>. La presencia de estrés oxidativo tiene lugar cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por parte de los leucocitos o por los espermatozoides anormales y/o se produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen. En diversos estudios se ha descrito que la presencia de radicales libres de oxígeno es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide<sup>12,16,17</sup>.

### **LESIÓN DEL ADN Y FERTILIDAD**

Se ha demostrado que en la concepción natural, el estado del ADN espermático es esencial para lograr el embarazo<sup>18,19</sup>. Cada vez hay más evidencia que sugiere que la presencia de daño en el ADN del espermatozoide debería de ser investigada de forma siste-

mática. Se ha demostrado que la presencia de un empaquetamiento defectuoso de la cromatina se correlaciona con una tasa baja de fertilización, tras fecundación *in vitro* (FIV) o inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)<sup>11,20</sup> y con una incidencia más alta de abortos<sup>18</sup>. La presencia de daño en el ADN también se correlaciona con el éxito de la inseminación intrauterina<sup>21</sup>. Se ha demostrado también que la presencia de defectos en el genoma masculino conduce a fracasos posfertilización<sup>13</sup>.

### **TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y LESIÓN EN EL ADN**

Recientemente, la presencia de anomalías en el ADN del espermatozoide ha sido muy destacada debido a diversas publicaciones en las que se correlaciona el grado de lesión con varios índices de fertilidad, como la tasa de fertilización, la tasa de división del embrión, la tasa de implantación, el índice de embarazos y el índice de nacido vivos.

Si el ADN del espermatozoide no puede decondensarse después de penetrar en el oocito, la fertilización puede fallar o puede tener lugar un fallo posfertilización debido a la presencia de ADN defectuoso espermático, lo que origina un embrión de escasa calidad<sup>22</sup>. La presencia de abortos podría ser debida a un aumento en el grado de daño en el ADN del espermatozoide. Por tanto, ésta podría ser la causa de los abortos inexplicados en algunas pacientes<sup>23</sup>. La tasa de embarazos y de nacidos a término después del recurso a técnicas de reproducción asistida también se asocia con la presencia de daño en el ADN del espermatozoide<sup>5</sup>. Además, el grado en el daño del ADN puede afectar a la capacidad de una pareja para concebir de forma natural<sup>18,19</sup>.

### **ADN y embarazo natural**

En 2 trabajos se ha examinado la relación entre daño en el ADN del espermatozoide, determinado mediante la técnica del análisis de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA), y la capacidad de una pareja para concebir<sup>18,19</sup>. En el estudio de Evenson et al<sup>18</sup> se incluyó a 200 parejas con deseo gestacional. Se detectó que la dificultad para concebir se daba en varones que presentaban lesiones en el ADN  $\geq 30\%$ . En otro estudio realizado por Spano et al<sup>19</sup> se evidenció que cuando el daño en el ADN es  $> 20\%$  se observa una disminución de la fertilidad. Cuando el grado de lesión en el ADN sobrepasa el 40%, la probabilidad de conseguir un embarazo es mínima.

### **DAÑO EN EL ADN Y FECUNDACIÓN *IN VITRO***

En numerosos estudios se muestra que los daños en el ADN espermático afectan a la fertilización y al embarazo tras la realización de una FIV. Sun et al<sup>10</sup> determinaron la fragmentación espermática del ADN mediante el método de TUNEL y hallaron que el 40% de los espermatozoides obtenidos de muestras seminales, procedentes de la consulta de esterilidad, contenía dichas fragmentaciones; asimismo, en la FIV observaron una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN y el índice de fertilización e implantación<sup>10</sup>.

Defectos en la condensación pueden originar una descondensación imperfecta del ADN espermático en el ooplasma, causando así una fecundación defectuosa<sup>24</sup>. El grado del daño del ADN espermático podría ser un índice predictivo del éxito en la FIV<sup>20</sup>.

Henkel et al<sup>25</sup> han comunicado que aunque la fragmentación del ADN no muestra una correlación con el índice de fertilización ni con la fragmentación del embrión, la tasa de gestaciones en la FIV es significativamente más baja cuando los espermatozoides valorados eran positivos para la prueba TUNEL ( $> 36\%$  espermatozoides positivos)<sup>25</sup>. Estos estudios apoyan los hallazgos de Twigg et al<sup>3</sup>, que comunican que un espermatozoide con el ADN dañado puede fertilizar un oocito mediante FIV o ICSI y formar un pronúcleo<sup>3</sup>. Sin embargo, dependiendo del grado de alteración del ADN, el desarrollo embrionario resulta afectado en fases posteriores y en situaciones severas puede conducir a la muerte del embrión.

### **DAÑO DEL ADN E ICSI**

El daño del ADN espermático, valorado mediante TUNEL, se relaciona inversamente con la tasa de fertilización en la ICSI<sup>11</sup>. En pacientes con un alto daño del ADN espermático ( $> 25\%$ ), la fertilización fue  $> 20\%$ .

La proporción de espermatozoides con fragmentación del ADN influye en la tasa de fecundación e implantación de los embriones obtenidos mediante ICSI y la sitúa cerca del 10%. No se originó ningún embarazo si habían más de un 20% de espermatozoides recuperados positivos para TUNEL, lo que sugiere que el daño del ADN puede tener un buen valor predictivo en los casos de fallo recidivante en la implantación de embriones de buena calidad<sup>26</sup>.

El índice de fragmentación del ADN (DFI) se correlacionó inversamente con la fecundación ( $r = -0,70$ ;  $p = 0,03$ ) y la calidad embrionaria ( $r = -0,70$ ;  $p = 0,03$ ) tras la realización de FIV e ICSI. El porcen-

taje de DFI era inferior en los varones infértiles que lograron un embarazo clínico después de una técnica de reproducción asistida<sup>21,13,25</sup> que en los que no hubo embarazo ( $p = 0,001$ )<sup>27</sup>.

Mediante la técnica SCSA se puede predecir la falta de embarazo cuando los espermatocitos recuperados muestran un desnaturalización del ADN ácido-inducido  $\geq 27\%$  de DFI<sup>28</sup>.

Sin embargo, en algunos estudios no se ha observado el efecto negativo de los espermatozoides con ADN defectuoso en la fecundación y el embarazo<sup>25,29,30</sup>. Hammadeh et al<sup>31</sup> no encontraron diferencias significativas en los índices de fertilización, implantación y embarazo en pacientes a los que se les realizaba ICSI con diferentes grados de descondensación nuclear espermática<sup>31,32</sup>.

Recientemente se ha publicado que el grado de fragmentación del ADN espermático y su estabilidad pueden predecir el éxito en el recurso a inseminaciones artificiales intrauterinas<sup>21</sup>. Los autores refirieron que el grado de fragmentación del ADN después de la preparación espermática era significativamente inferior en las muestras que obtuvieron el embarazo en relación con las que no lo lograron. No se consiguieron embarazos en las pacientes en las que se utilizaron muestras con  $> 12\%$  de los espermatozoides con el ADN fragmentado.

## MÉTODOS PARA MEDIR LAS LESIONES EN EL ADN

En la actualidad se dispone de distintas técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN<sup>33</sup>. A continuación se resumen sus bases metodológicas y algunas de las correlaciones de los resultados de las distintas técnicas con la distintos parámetros de infertilidad en el varón.

### Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling) es uno de los más utilizados para medir las anomalías del ADN. En varios estudios se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la movilidad, la concentración y la morfología del eyaculado. En diversos estudios que han utilizado este ensayo TUNEL se ha abordado su utilidad como predictor del éxito en las técnicas de reproducción asistida<sup>21,34,35</sup>.

El ensayo TUNEL se basa en el principio de que la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora dUTP en roturas de cadenas dobles o simples del

ADN. En concreto, en el ensayo se incorpora desoxiuridina biotinilada al 3'OH del ADN. La biotina actúa como señal y puede ser detectada fácilmente, por ejemplo, a través de técnicas fluorescentes. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor será la señal resultante. En los espermatozoides con ADN normal sólo se detecta fluorescencia de fondo, mientras que los espermatozoides con ADN fragmentado (múltiples 3'-OH terminales) se tiñen con una fluorescencia intensa<sup>36</sup>. La fluorescencia puede detectarse tanto por citometría de flujo como a través de microscopía fluorescente<sup>37</sup>.

## ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CROMATÍNICA DEL ESPERMATOZOIDE (SCSA)

La técnica SCSA (sperm chromatin structure assay) se basa en el principio de que la cromatina anormal presenta una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente. El grado de desnaturalización resultante como consecuencia de su tratamiento mediante calor o con ácido se determina midiendo el cambio metacromático del colorante naranja de acridina (*acridine orange* [AO]) de fluorescencia verde (AO intercalado) a una fluorescencia roja (AO sin intercalar)<sup>38</sup>. Los resultados se expresan como el índice de fragmentación de ADN (DFI). Dado que los resultados del SCSA son más constantes en períodos prolongados que los parámetros de la OMS, esta técnica resulta apropiada en estudios epidemiológicos de la esterilidad masculina<sup>39</sup>. El SCSA se ha usado para predecir la capacidad de fertilización, implantación y embarazo tras las técnicas de reproducción asistida (TRA)<sup>40</sup>. Los resultados de SCSA también se han correlacionado con la fertilidad *in vivo*<sup>41</sup>.

### Ensayo comet

El ensayo comet, también conocido como electroforesis de células únicas para el análisis del ADN de una sola célula, fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson en 1984<sup>42</sup> y fue modificado posteriormente en 1988<sup>43</sup>. Cuando se descondensa el ADN del espermatozoide en el seno de un gel y se somete a la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se desplazan y generan una imagen en forma de cometa (de ahí el nombre de ensayo comet). La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola. A su vez pueden utilizarse también otros parámetros de medida, tales como el "momento de la cola", que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción del total del ADN de la cola)<sup>44</sup>.

El ensayo comet ha sido usado de forma satisfactoria en la evaluación de la presencia de daño en el ADN tras la criopreservación de los espermatozoides<sup>45</sup>. También se ha descrito que puede predecir el porcentaje de desarrollo embrionario tras FIV e ICSI, especialmente en parejas con esterilidad de causa desconocida<sup>22,46</sup>.

### Ensayo *in situ* nick translation

El análisis de *in situ* nick translation (NT) cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato) biotinilado a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo NT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN. Los resultados del análisis de NT 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<sup>5,9</sup>. Los resultados del análisis de NT muestran una correlación muy buena con la sensibilidad de CMA<sub>3</sub> y el análisis TUNEL ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,05$  y  $r = 0,87$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). También se ha utilizado el análisis de NT para demostrar la presencia de daño en el ADN debido a la presencia de radicales libres originados por la presencia de leucocitos en el tracto reproductor masculino<sup>48</sup>.

### Test de naranja de acridina

El ensayo naranja de acridina mide la susceptibilidad del ADN del espermatozoide al ácido inducido por la desnaturalización *in situ* por cuantificación del cambio metacromático del naranja de acridina fluorescente del verde (ADN natural) al rojo (ADN desnaturalizado). El naranja de acridina fluorescente se intercala entre las dobles cadenas de ADN como un monómetro y liga las cadenas simples del ADN como un agregado. El naranja de acridina monométrico vira al ADN natural o verde fluorescente mientras que el naranja de acridina agregado al ADN desnaturalizado vira a rojo fluorescente<sup>49</sup>. El naranja de acridina puede usarse tanto con el microscopio de fluorescencia como con citometría de flujo.

Tinciones con naranja de acridina muestran una diferencia significativa entre los varones fértiles y aquellos que son infértiles por diferentes patologías andrológicas. El valor de corte entre varones fértiles e infértiles varía entre el 20 y el 50%<sup>18,50,51</sup>.

## SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DEL DAÑO DEL ADN ESPERMÁTICO

Los parámetros seminales convencionales no son útiles en los pacientes con esterilidad idiopática. Tampoco en las técnicas de reproducción asistida estos parámetros seminales clásicos tienen mayor importancia. Las técnicas de reproducción asistida suponen un salto en los mecanismos de selección espermática natural y permiten incrementar las posibilidades de que un espermatozoide pueda fertilizar un oocito<sup>52</sup> con material genómico alterado. Las circunstancias cambiantes obligan al desarrollo de procedimientos alternativos que permitan evaluar la calidad espermática, tales como el estudio del daño del ADN espermático, procedimiento que adquiere una mayor relevancia y del que en la actualidad disponemos ya de numerosa información que lo relaciona con las técnicas de reproducción asistida y con el embarazo natural. La mayoría de los estudios muestran una significativa correlación inversa del daño del ADN espermático y el índice de fertilidad.

En algunas publicaciones se no ha encontrado una relación entre el daño del ADN espermático y el índice de fertilidad, ya que se sugiere que el ICSI evita los mecanismos naturales de selección espermática, lo que permite que espermatozoides con alteraciones del ADN puedan fertilizar oocitos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios refiere una relación entre el deterioro del ADN espermático y los índices de embarazo, lo que pone de manifiesto que el embrión emplea determinados mecanismos con fin de prevenir la posible transmisión de anomalías en el material genómico. La aparente disparidad en algunas observaciones puede ser explicada por la variedad de las técnicas empleadas en la medición del daño del ADN espermático, así como por el recurso a técnicas de reproducción asistida en pacientes con diversas etiologías y no sólo en los afectados de un factor masculino.

Cuando un espermatozoide con un severo daño en su ADN fertiliza un oocito, 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 daño en su ADN es utilizado, el desarrollo fetal puede verse afectado más tardíamente y puede dar lugar a un niño con anomalías congénitas.

En conclusión, en la actualidad se dispone de bibliografía en la que se evidencia que el daño espermático puede influir en la fertilidad de las parejas, incluso si el espermatozoide con alteraciones del ADN fertiliza un óvulo y origina un nacimiento, ya que es posible que se produzca una anomalía congénita. Por

tanto, es prudente controlar el daño del ADN en los pacientes estériles y se debe protocolizar de manera sistemática el estudio cromosómico del daño del ADN en los laboratorios clínicos. Los resultados del daño del ADN pueden ayudar al clínico en la evaluación y mejor consejo de las parejas estériles en relación con sus posibilidades de lograr una gestación a término y obtener un niño sin alteraciones.

### Bibliografía

1. McLachlan RI, Baker HW, Clarke GN, Harrison KL, Matson PL, Holden CA, et al. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology*. 2003;35:25-33.
2. Guzick D, Sullivan M, Adamson G, Cedars M, Falk R, Peterson E, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1998;70:207-13.
3. Twigg J, Irvine D, Aitken J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13:1864-71.
4. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes M. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001;75:674-77.
5. Tomlinson M, Moffatt O, Manicardi G, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001;16:2160-5.
6. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl*. 2002;23:717-23.
7. Gil-Guzman E, Ollero M, López M, Sharma R, Álvarez J, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001;16:922-30.
8. Ollero M, Gil-Guzmán E, López M, Sharma R, Agarwal A, Larson K, 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;16:1912-21.
9. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21:33-44.
10. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997;56:602-7.
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. *Fertil Steril*. 1998;69:528-32.
12. Agarwal A, Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9:331-45.
13. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999;4:31-7.
14. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:529-36.
15. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829-43.
16. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000;15:1338-44.
17. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Jr, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004;19:129-38.
18. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039-49.
19. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 2000;73:43-50.
20. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Prinsloo E, Van Rooyen LH. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum Reprod*. 2000;15:657-61.
21. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2002;17:3122-8.
22. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod*. 2002;17:1856-62.
23. Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hatasaka H, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 2003;49:49-55.
24. Haidl G, Schill WB. Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. *Arch Androl*. 1994;32:263-6.
25. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:477-84.
26. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18:1023-8.
27. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, 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 3:1597-605.
28. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003;80:895-902.
29. Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998;69:740-7.
30. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79:559-63.
31. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, et al. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*. 1996;11:2468-71.
32. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Gauss C, Rosenbaum P, Georg T, Diedrich K, et al. Predictive value of chromatin decondensation in vitro on fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl*. 2001;24:311-6.
33. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, et al. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol*. 2003;518:253-68.
34. Sun J, Jurisicova A, Casper R. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997;56:602-7.
35. Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hatasaka H, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 2003;49:49-55.
36. Gorkczyza 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*. 1993;53:1945-51.
37. Lopes S, Jurisicova A, Sun J, Casper R. Reactive oxygen species: a potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998;13:896-900.
38. Darzynkiewicz Z, Traganos F, sharpless T, Melamed M. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange

- staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res.* 1975; 90:411-28.
39. Spano M, Kolstad A, Larsen S, Cordelli E, Leter G, Giwerzman A, et al. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Hum Reprod.* 1998;13:2495-505.
  40. Larson K, DeJonge C, Barnes A, Jost L, Evenson D. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000;15:1717-22.
  41. Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14:1039-49.
  42. Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages on individual cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:291-8.
  43. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-91.
  44. Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. the concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res.* 1995;326:123-31.
  45. Duty S, Singh N, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Huang T, et al. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod.* 2002;17:1274-80.
  46. Morris I, Ilott S, Dixon L, Brison D. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization. *Hum Reprod.* 2002;17:990-8.
  47. Manicardi G, Bianchi P, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995;52:864-7.
  48. Aitken R, Irvine D, Wu F. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:542-51.
  49. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril.* 1996;66:634-9.
  50. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia.* 1999;31:277-82.
  51. Zini A, Fischer M, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K. Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology.* 2002;60:1069-72.
  52. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon: a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 1999;115:1-7.