

PROGRESOS de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

www.elsevier.es/pog



ORIGINAL

Estudio de la integridad del ADN espermático en relación con la calidad seminal y los resultados del ciclo de fecundación in vitro

María Sánchez Toledo*, Cristina Álvarez Lleó, Carmen García Garrido
y Gaspar González de Merlo

Unidad de Reproducción Humana, Servicio de Obstetricia y Ginecología,
Hospital General Universitario de Albacete, Albacete, España

Recibido el 17 de octubre de 2011; aceptado el 18 de noviembre de 2011
Disponible en Internet el 7 de noviembre de 2012

PALABRAS CLAVE

Aborto;
Fecundación;
Fragmentación ADN
espermático;
Gestación;
*Sperm chromatin
structure assay*

Resumen

Objetivo: Analizar la relación existente entre el grado de fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales, la edad del varón y los resultados del ciclo de FIV-ICSI.

Sujetos y métodos: Cuarenta y tres pacientes sometidos a tratamientos de FIV-ICSI. La edad media de los varones fue $35,62 \pm 4,87$ años. En este estudio prospectivo analizamos la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de SCSA (*sperm chromatin structure assay*) y los parámetros seminales clásicos (concentración, movilidad y morfología espermática). Los parámetros del ciclo de FIV-ICSI analizados fueron: tasa de fecundación, calidad embrionaria, tasa de embarazo, tasa de gestación y tasa de aborto.

Resultados: La fragmentación del ADN está relacionada con un descenso en la movilidad progresiva de la muestra en fresco ($p = 0,000$) y capacitada ($p = 0,041$). También observamos un descenso en la movilidad progresiva de la muestra en fresco ($p = 0,034$) y en la calidad del ADN espermático ($p = 0,043$) en pacientes de mayor edad. No observamos relación entre la fragmentación y la tasa de fecundación, calidad embrionaria, tasa de embarazo y tasa de aborto.

Conclusiones: El grado de fragmentación del ADN está inversamente correlacionado con la movilidad progresiva de la muestra seminal en fresco. La fragmentación del ADN no es útil como predictor del resultado del ciclo de FIV-ICSI, pero sí podría ser útil como herramienta diagnóstica ya que añade información al análisis seminal básico. Su valoración podría resultar de utilidad en determinados pacientes, como aquellos que presentan esterilidad idiopática. La calidad espermática del varón se ve afectada por el aumento en la edad.

© 2011 SEGO. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mariasancheztoledo@hotmail.com
(M. Sánchez Toledo).

KEYWORDS

Fertilization;
Gestation;
Miscarriage;
Sperm chromatin
structure assay;
Sperm DNA
fragmentation

Sperm DNA fragmentation in relation to seminal parameters and outcome of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection

Abstract

Objective: To establish the relationship between the degree of sperm DNA fragmentation and seminal parameters, male age and outcome of *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI).

Subjects and methods: The sample consisted of 43 couples undergoing IVF/ICSI. The mean age of men was 35.62 ± 4.87 years and that of women was 33.88 ± 3.95 years. We prospectively analyzed sperm DNA fragmentation from each patient by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and correlated the findings with seminal parameters (volume, concentration, progressive motility and morphology), IVF/ICSI outcomes and male age. IVF/ICSI outcome was evaluated by measuring the fertilization rate, embryo quality and the pregnancy and miscarriage rates.

Results: DNA fragmentation was negatively correlated with progressive motility ($p = 0.000$) of fresh and capacitated ($p = 0.041$) semen. Older patients had a significantly lower percentage of progressive motility in fresh seminal samples ($p = 0.034$) and worse sperm DNA quality ($p = 0.043$). There were no significant differences between the fragmentation rate and fertilization rate, embryo quality, and the pregnancy and miscarriage rates.

Conclusions: DNA fragmentation is inversely correlated with progressive motility in fresh seminal samples. DNA fragmentation does not predict the IVF/ICSI outcome but screening for sperm DNA damage may provide useful information in the diagnosis of idiopathic male infertility. Seminal quality is affected by increasing male age.

© 2011 SEGO. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La esterilidad es un problema que afecta aproximadamente al 15% de las parejas en edad reproductiva, siendo alrededor del 50% de los casos debido a factor masculino.

La calidad del semen es uno de los factores determinantes de éxito en un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV). Actualmente, se evalúa mediante un análisis convencional basado en la observación microscópica. Con esta técnica se determina la concentración, la movilidad y la morfología de los espermatozoides; sin embargo, no aporta información sobre alteraciones que afectan a la integridad del genoma masculino.

El principal problema de este análisis es que es muy subjetivo¹, presenta una alta variabilidad interobservador y limita el recuento a unos cientos de espermatozoides, lo que hace que el error de medida se incremente². Además, su valor es limitado para predecir el éxito en ciclos de FIV-ICSI, pues se estima que en un 15% de las parejas estériles el varón presenta un seminograma con parámetros dentro de rangos normales³, por lo que es probable que existan otro tipo de daños que no detectamos y que afecten al ADN espermático.

La integridad del ADN del espermatozoide se podría considerar como un parámetro independiente e indicativo de su calidad, de vital importancia en la correcta fecundación del ovocito y posterior desarrollo del embrión⁴⁻⁶. Por ello, en determinados pacientes que van a ser sometidos a técnicas de reproducción asistida (TRA) es necesaria una valoración de su fragmentación, debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia.

Diversos trabajos han demostrado que los espermatozoides humanos presentan elevadas tasas de ADN dañado que se incrementan en situaciones patológicas que conducen a la esterilidad⁷. Las causas de la fragmentación del ADN no se conocen con exactitud, aunque parece que están implicados

errores en el empaquetamiento del ADN, desequilibrios de los niveles de especies reactivas del oxígeno y procesos apoptóticos defectuosos durante la maduración espermática.

Material y métodos**Pacientes**

Se utilizaron muestras seminales pertenecientes a 43 pacientes sometidos a tratamientos de FIV-ICSI en el Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA). La media de edad de los varones fue $35,62 \pm 4,87$ años y la de las mujeres $33,88 \pm 3,95$ años. Ningún paciente había conseguido embarazo tras un año de relaciones sin protección. Este trabajo fue aprobado por el comité ético de nuestro hospital y todos los pacientes participantes firmaron un consentimiento informado.

Técnica de fecundación *in vitro*

La hiperestimulación ovárica controlada (HOC) se llevó a cabo utilizando los protocolos de la unidad de reproducción del CHUA⁸. El control de la respuesta ovárica se realizó mediante el seguimiento ecográfico del crecimiento folicular y la determinación del estradiol en sangre circulante. La recuperación ovocitaria se realizó 34-36 h después de la administración de la hCG (Ovitrelle®, Laboratorios Merck-Serono o hCG-lepori®, Angelini Farmacéutica), mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía, bajo anestesia general o locorregional.

Las muestras seminales se obtuvieron por masturbación en recipientes de plástico estériles tras un periodo de abstinencia de entre 3 y 5 días. El periodo transcurrido entre la

recogida de la muestra y su valoración fue inferior a 1 h. Las muestras se dejaron licuar en un incubador a 37 °C, 6% de CO₂ y humedad de saturación. Se evaluaron el volumen, la concentración, la movilidad y la morfología seminal según las normas de la OMS⁹. Las muestras seminales se prepararon mediante *swim-up* convencional, lavándolas con medio de cultivo para gametos (G-IVF™ Plus, Vitrolife, Göteborg, Suecia). Se recuperó el sobrenadante, valorándose el recuento y la movilidad de la muestra capacitada.

Se valoró la madurez de los ovocitos recuperados. Los ovocitos MII se microinyectaron, evaluándose la fecundación a las 17-20 h. La selección embrionaria se llevó a cabo en día 2-3 postpunción, clasificando los embriones en tipo A, tipo B, tipo C y tipo D según los criterios de ASEBIR¹⁰. Se transfirió un máximo de 3 embriones en función de la edad e historia clínica de la paciente.

La fase lútea se suplementó con 600 mg/24 h de progesterona natural (Progeffik®, Effik).

El diagnóstico de gestación se realizó mediante determinación de la β hCG sérica a los 15 días de la punción folicular. Cuando fue positiva (> 20 U/ml), se confirmó la gestación dos semanas después mediante hallazgo ecográfico de saco gestacional intrauterino.

Para valorar el resultado del ciclo de FIV-ICSI se consideraron: tasa de fecundación, calidad embrionaria el día de la transferencia, tasa de embarazo, tasa de aborto bioquímico y de aborto en el primer trimestre y tasa de gestación clínica.

Análisis de la cromatina espermática mediante *sperm chromatin structure assay*

Una alícuota seminal de la muestra en fresco, tras su licuefacción durante 30 min a 37 °C y 6% de CO₂, se utilizó para evaluar la fragmentación del ADN espermático mediante SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), siguiendo el protocolo descrito por Evenson¹¹. La técnica SCSA se basa en la mayor susceptibilidad *in situ* de la cromatina anormal a desnaturalizarse parcialmente¹¹. El grado de desnaturalización resultante tras un tratamiento ácido se determina midiendo el cambio metacromático del fluorocromo naranja de acridina de fluorescencia verde a fluorescencia roja. El fluorocromo naranja de acridina se intercala entre las cadenas dobles como un monómero emitiendo fluorescencia verde y se liga a las cadenas sencillas como un agregado emitiendo fluorescencia roja. El cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia roja más la verde permite calcular el índice de fragmentación de ADN (DFI) de una muestra.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en media \pm DE y porcentajes. Se comprobó la normalidad de las funciones de distribución para cada uno de los conjuntos de datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para valorar el grado de correlación entre variables se utilizó la correlación bivariada de Pearson si las variables eran paramétricas y la regresión de Spearman si no lo eran.

Con el objetivo de intentar determinar la capacidad predictiva de algunos parámetros sobre los resultados del ciclo, se realizó un análisis de regresión logística.

La significación de las diferencias fue estimada utilizando el test de la t de Student para variables paramétricas y la prueba de la U de Mann-Whitney para las no paramétricas.

Las diferencias que mostraron valores de $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 17.0 del programa SPSS para Windows (SPSS© Inc. 2008).

Resultados

Inicialmente, correlacionamos el grado de fragmentación del ADN espermático con la edad del varón, los parámetros del seminograma y los resultados del ciclo. Observamos una correlación negativa entre la fragmentación (%DFI) y la movilidad progresiva en fresco ($p = 0,000$), y la concentración ($p = 0,015$) y la movilidad progresiva ($p = 0,041$) de la muestra capacitada (tabla 1). No observamos ninguna diferencia significativa entre el grado de fragmentación y la tasa de fecundación, calidad embrionaria, tasa de embarazo y tasa de aborto.

Dividimos a los pacientes en dos grupos de edad, ≤ 36 años y > 36 años. Se compararon los parámetros seminales y los resultados del ciclo de FIV-ICSI entre los dos grupos de edad. Observamos una mayor movilidad progresiva en fresco ($p = 0,034$) (tabla 2) y un menor grado de fragmentación del ADN ($p = 0,04$) (fig. 1) en el grupo de pacientes más jóvenes. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración en fresco ni en la tasa de fecundación. Tampoco se observaron diferencias en la calidad de los embriones y en la tasa de gestación (datos no mostrados).

Para estimar cómo afectaba la edad de ambos miembros de la pareja a la tasa de gestación, se realizó una regresión logística, no encontrando diferencias significativas. Aunque sí que observamos una tendencia con la edad a disminuir la tasa de embarazo y a aumentar la de aborto, sin embargo, esta última no la pudimos comparar estadísticamente debido al pequeño tamaño muestral (datos no mostrados).

Por otra parte, clasificamos el grado de fragmentación en dos grados: fragmentación leve ($\leq 10\%$) y fragmentación moderada y alta ($> 10\%$) (fig. 2). Al comparar la media de edad entre los grupos observamos un aumento en la media de edad en el grupo de mayor fragmentación ($p = 0,043$). Asimismo, observamos diferencias estadísticamente significativas en la movilidad progresiva ($p = 0,002$) y en la

Tabla 1 Correlación de la edad, parámetros clásicos del seminograma y la tasa de fecundación con el grado de fragmentación del ADN

	DFI %	p
Edad	0,232	0,145
Concentración fresco	-0,53	0,742
Movilidad progresiva fresco	-0,563	0,000*
Concentración capacitado	-0,378	0,015*
Movilidad progresiva capacitado	-0,321	0,041*
Morfología	-0,295	0,610
Tasa de fecundación	0,165	0,303

Los valores indican el coeficiente de correlación.

$p < 0,05$.

* Diferencias estadísticamente significativas.

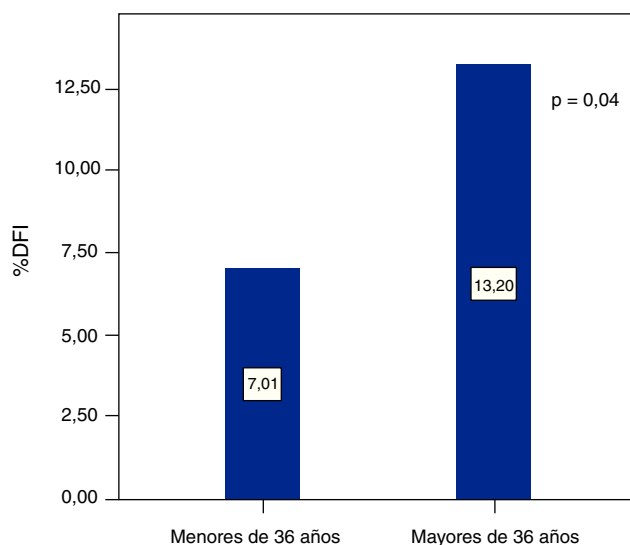
Tabla 2 Comparación de los valores del seminograma y la tasa de fecundación entre ambos grupos de edad

	≤ 36 años n = 24	> 36 años n = 19	p
Concentración fresco (10^6 /ml)	68,78 ± 58,38	38,90 ± 40,53	0,080
Movilidad progresiva fresco (%)	41,42 ± 21,22	30,47 ± 16,64	0,034*
Concentración capacitado (10^6 /ml)	9,53 ± 13,91	5,62 ± 4,81	0,310
Movilidad progresiva capacitado (%)	79,08 ± 20,41	73,53 ± 27,85	0,686
Morfología (% formas normales)	3,12 ± 2,15	3,05 ± 2,71	0,692
Tasa de fecundación (%)	68,67 ± 17,26	58,17 ± 18,55	0,062

Los datos están expresados en media ± desviación estándar.

p < 0,05.

* Diferencias estadísticamente significativas.

**Figura 1** Media del grado de fragmentación del ADN espermático (%DFI) entre los grupos de edad.

morfología ($p = 0,016$) de la muestra en fresco y en la concentración de la muestra capacitada ($p = 0,014$) (tabla 3). No encontrando diferencias en cuanto a tasa de fecundación, calidad embrionaria y tasa de gestación.

Por otro lado, quisimos estudiar si existían diferencias entre aquellos pacientes con muestras seminales normales y aquellos con muestras patológicas. En este caso, se encontró una relación estadísticamente significativa con el grado de

fragmentación que fue mayor en el grupo de pacientes patológicos ($p = 0,007$). También observamos un incremento de la edad en aquellos pacientes con alguna patología seminal ($p = 0,042$) (tabla 4). Tampoco se hallaron diferencias en cuanto a calidad embrionaria y tasa de gestación.

Discusión

En estos últimos años, la fragmentación del ADN ha cobrado un gran interés como posible marcador de calidad seminal y predictor del ciclo de FIV-ICSI. El problema es que a día de hoy sigue sin existir consenso en relación con su utilidad en la práctica clínica. En este estudio hemos demostrado una relación entre la fragmentación del ADN espermático y un descenso en la calidad seminal que viene marcado por un descenso en la movilidad progresiva en fresco ($p = 0,000$), en la concentración ($p = 0,015$) y la movilidad progresiva de la muestra capacitada ($p = 0,041$). El incremento en los niveles de fragmentación y el descenso en la movilidad puede deberse a alteraciones en el empaquetamiento del ADN: una incompleta oxidación de los grupos tioles libres de las protaminas durante el tránsito espermático por el epidídimo podría llevar a una desestabilización del ADN y, por lo tanto, a una mayor susceptibilidad a su fragmentación^{12,13}. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores¹³⁻¹⁷. Sin embargo, no se observa ninguna relación entre el grado de fragmentación y la tasa de fecundación, calidad embrionaria y tasa de embarazo o tasa de aborto por lo que la fragmentación no nos sirve como predictora del ciclo de FIV-ICSI.

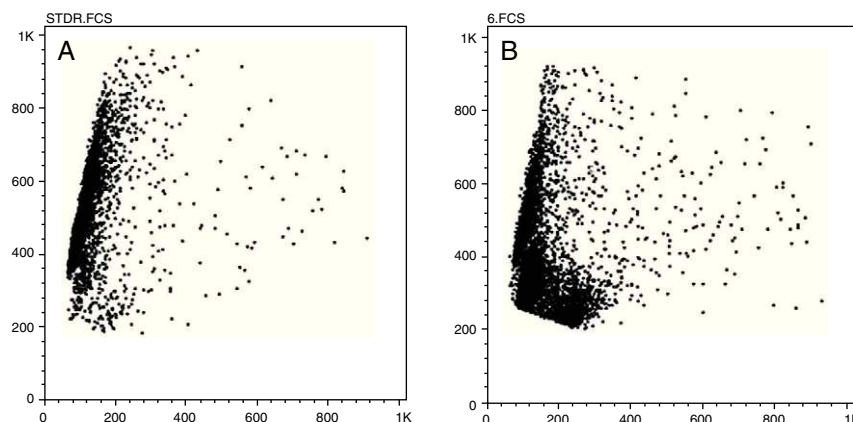
**Figura 2** Diagrama de puntos de dos pacientes de nuestro estudio. El diagrama A pertenece a un paciente con menos del 10% de % DFI. El diagrama B pertenece a un paciente con un % DFI mayor del 10%.

Tabla 3 Comparación de la edad, los valores del seminograma y la tasa de fecundación entre los grupos de fragmentación (% DFI)

	≤ 10% DFI n = 27	> 10% DFI n = 14	p
Edad (años)	34,71 ± 4,95	37,95 ± 4,12	0,043*
Concentración fresco (10 ⁶ /ml)	55,38 ± 45,14	53,5 ± 64,9	0,914
Movilidad progresiva fresco (%)	44,19 ± 17,77	24,57 ± 17,07	0,002*
Concentración capacitado (10 ⁶ /ml)	9,98 ± 13,10	4,01 ± 3,73	0,014*
Movilidad progresiva capacitado (%)	83,74 ± 14,17	64,29 ± 33,74	0,185
Morfología (% formas normales)	3,81 ± 2,20	1,92 ± 2,40	0,016*
Tasa de fecundación (%)	63,27 ± 53	67,00 ± 21,19	0,551

Los datos están expresados en media ± desviación estándar.

p < 0,05.

* Diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4 Comparación de la edad, % DFI y la tasa de fecundación entre pacientes con semen patológico y normal

	Semen patológico n = 34	Semen normal n = 9	p
Edad (años)	36,49 ± 4,19	32,33 ± 6,02	0,042*
% DFI (%)	11,34 ± 9,82	4,70 ± 2,24	0,007*
Tasa de fecundación (%)	65,10 ± 18,15	60 ± 19,87	0,508

Los datos están expresados en media ± desviación estándar.

p < 0,05.

* Diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, al dividir los pacientes en grupos de edad también encontramos un descenso en la calidad seminal en aquellos pacientes con más de 36 años. En este grupo observamos un descenso en la movilidad progresiva en fresco y un aumento de la fragmentación del ADN. Este descenso de la calidad seminal en los pacientes de mayor edad puede deberse a un descenso en la actividad apoptótica durante la espermatogénesis con la edad. El grupo de Singh et al.¹⁸ observó que con el aumento de la edad se alteraban los mecanismos de detección y eliminación de células espermáticas apoptóticas durante la espermatogénesis. Por tanto, parece evidente que con la edad avanzada del varón la producción de espermatozoides se puede mantener, incrementándose las formas anormales y los espermatozoides con ADN dañado, y disminuyendo la movilidad. Algunos autores han sugerido una condensación anormal de la cromatina en varones con edad avanzada¹⁹, asociando el daño con una disminución de la fecundación y embarazo²⁰⁻²². No obstante, otros autores no detectaron alteración de estos parámetros pero sí un incremento en la tasa de abortos espontáneos^{23,24}.

Del mismo modo, decidimos ver en qué medida afectaba la edad de ambos miembros de la pareja a las tasas de fecundación y de gestación; sin embargo, sólo observamos una tendencia con la edad a disminuir la tasa de embarazo y aumentar la de aborto sin encontrar diferencias significativas, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Asimismo, tratamos de valorar cómo afectaban los distintos grados de fragmentación a la calidad espermática. Para ello dividimos a los pacientes en dos grupos según el nivel de fragmentación (≤ 10% DFI y > 10% DFI). Al comparar las medias de los parámetros del espermiograma clásico entre ambos grupos (≤ 10% DFI y > 10% DFI) encontramos diferencias significativas en la movilidad progresiva de la muestra en fresco (p = 0,002) y en la concentración de la muestra capacitada (p = 0,014), así como en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal

(p = 0,016), siendo los 3 parámetros mayores en el grupo con menor fragmentación. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que también encontraron un descenso en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales al aumentar el daño en el ADN^{14,17,25,26}. El grupo de Zini et al.²⁷ apunta a una posible relación entre una deficiencia en el contenido de protaminas o una incompleta oxidación de los grupos tioles de las protaminas y los defectos en la morfología espermática, como se ha visto en distintos modelos animales²⁷⁻²⁹. También encontramos un aumento en la media de la edad en aquellos pacientes con mayor nivel de fragmentación (p = 0,043), lo que de nuevo muestra un descenso en la calidad seminal en relación con la edad.

El daño en el ADN puede ser causado por multitud de agentes externos como son las especies reactivas del oxígeno (ERO). En varones jóvenes expuestos puntualmente a altos niveles de ERO, es posible que los procesos apoptóticos se incrementen en la misma medida, eliminándose todas las células dañadas. Sin embargo, en el caso de varones de edad avanzada, no se produce este incremento, lo que se traduce en un mayor número de espermatozoides con fenotipo apoptótico en el eyaculado.

Otras razones para este descenso en la calidad del ADN con la edad podría ser la pérdida de los «agentes secuestradores» (scavenging) de las ERO y la exposición continuada a factores ambientales tóxicos o incluso la presencia de mutaciones en los genes responsables de las rutas activadoras de la apoptosis.

En esta misma línea también existen estudios que indican que un mayor tiempo de abstinencia en los varones provoca mayores niveles de fragmentación, lo que podría relacionarse con un mayor tiempo de exposición a las ERO y por tanto con un mayor daño del ADN^{30,31}.

Otra de las cuestiones planteadas es si existen diferencias entre aquellos pacientes que presentan unos valores seminales dentro de la normalidad y aquellos que presentan algún tipo de patología seminal. En este caso es muy evidente la diferencia en los niveles de daño en el ADN entre los

pacientes normozoospermicos ($4,70 \pm 2,24$) y los pacientes con alguna patología ($11,34 \pm 9,82$) ($p = 0,007$).

Aunque conocemos algunas causas del aumento en la fragmentación del ADN, los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se produce este daño en el ADN espermático no se conocen con exactitud. Existen numerosos test para medir el daño en el ADN, pero no existe un consenso en cuanto a cuál es la técnica óptima a utilizar y cuáles son los valores clínicos límite. En hombres estériles, altos niveles de fragmentación del ADN tienen un impacto negativo en la concepción natural y mediante inseminación artificial, pero el impacto de la fragmentación sobre los resultados de técnicas de FIV convencional e ICSI sigue siendo un tema muy controvertido.

Según nuestro estudio, podemos concluir que un aumento en la fragmentación del ADN está relacionado con una peor calidad seminal determinada por un descenso en la movilidad espermática. A su vez, el aumento en la edad de los varones conlleva un aumento en la fragmentación del ADN y una peor movilidad espermática, por tanto una peor calidad seminal. No obstante, la fragmentación del ADN no nos sirve como marcador del resultado del ciclo de FIV-ICSI, aunque su determinación añade poder diagnóstico al análisis seminal básico y puede ser útil en determinados pacientes con esterilidad idiopática.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*. 1990;54:308–14.
2. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23:25–43.
3. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1998;70:207–13.
4. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999;4:31–7.
5. Mortimer D. The future of male infertility management and assisted reproduction technology. *Hum Reprod*. 2000;15:98–110.
6. Sakkas D, Tomlinson M. Assessment of sperm competence. *Semin Reprod Med*. 2000;18:133–9.
7. Smith RK. Aumento del daño en el ADN y estrés oxidativo en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptoquidismo. *Rev Medica Chile*. 2007;135:279–86.
8. Alvarez C, Taronger R, García-Garrido C, González de Merlo G. Zygote score and status 1 or 2 days after cleavage and assisted reproduction outcome. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008;101:16–20.
9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
10. Asebir (2008). II Criterios de Valoración Morfológicos de Ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 2ª ed. Madrid.
11. Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg G, Purvis K, et al. Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039–49.
12. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-sulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl*. 1992;13:342–8.
13. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *Androl*. 2002;23:717–23.
14. 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.
15. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril*. 2003;80:1404–12.
16. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2007;87:93–100.
17. Varghese AC, Bragais FM, Mukhopadhyay D, Kundu S, Pal M, Bhattacharyya AK, et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia*. 2009;41:207–15.
18. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003;80:1420–30.
19. Haild G, Jung A, Schill WB. Ageing and sperm function. *Hum Reprod*. 1996;11:558–60.
20. Tomlinson M, Moffat 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.
21. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Cur Opin Urol*. 2006;6:428–34.
22. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*. 2008;90:352–9.
23. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol*. 2005;161:816–23.
24. Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S. Paternal age and spontaneous abortion. *Obstet Gynecol*. 2006;108:369–77.
25. Trisini AT, Singh NP, Cuty SM, Hauser R. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril*. 2004;82:1623–32.
26. Liu DY, Baker HW. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod*. 2007;22:1597–602.
27. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl*. 2009;30:219–29.
28. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*. 2001;28:82–6.
29. Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, et al. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*. 2005;25:7107–19.
30. Richthoff J, Spano M, Giwercman YL, Frohm B, Jepson K, Malm J, et al. The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod*. 2002;17:3162–9.
31. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnhem N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:9601–6.