

REVISIONES

Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático

Juan G. Álvarez

Instituto Marqués. Barcelona. España. Centro ANDROGEN. La Coruña. España. Harvard Medical School. Boston. Estados Unidos.

RESUMEN

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término, tanto *in vivo* como *in vitro*. La presencia en el genoma del embrión de roturas en las cadenas del ADN y/o modificaciones en los nucleótidos del ADN provenientes del genoma paterno, que se pudiesen reparar o no por ovocito tras la fecundación, no es compatible con un desarrollo embrionario y fetal normal. Recientemente se ha demostrado que la fragmentación del ADN espermático es una causa potencial de infertilidad de causa desconocida. En esta revisión se discutirán los mecanismos responsables de fragmentación de ADN en espermatozoides humanos, incluyendo la apoptosis en el epitelio de los túbulos seminíferos durante el proceso de espermatozoígenesis, los defectos en el remodelado de la cromatina durante la espermatogénesis, el daño inducido por radicales libres (ROS) durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo, la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas y el daño inducido por la quimio y la radioterapia. Además, se describirán los diferentes tipos de tests utilizados para el estudio de la fragmentación del ADN espermático y sus aplicaciones clínicas al diagnóstico y tratamiento de la infertilidad.

Palabras clave: Fragmentación de ADN. Fecundación *in vitro*. Radicales libres. Estrés oxidativo. Caspasas. Endonucleasas. Quimioterapia. Radiación ionizante.

ABSTRACT

Clinical applications of the study of DNA fragmentation in sperm

The integrity of the paternal genome is of paramount importance in the initiation and maintenance of a viable pregnancy *in vivo* and *in vitro*. The presence in the embryonic genome of DNA strand breaks and/or modifications in DNA nucleotides originating in the paternal genome, which have not been repaired by the oocyte after fertilization, is not compatible with normal embryo and fetal development. DNA fragmentation in human spermatozoa has recently been shown to be a potential cause of unexplained infertility. In this review, the mechanisms responsible for DNA fragmentation in human sperm are discussed. These mechanisms include apoptosis in the seminiferous tubule epithelium, defects in chromatin remodeling during the process of spermiogenesis, reactive oxygen species (ROS)-induced DNA damage during sperm migration from the seminiferous tubules to the epididymis, activation of sperm caspases and endonucleases, and damage induced by chemo- and radiotherapy. In addition, the various tests used to determine DNA fragmentation in human sperm and their clinical applications in the diagnosis and treatment of infertility are described.

Key words: DNA fragmentation. *In vitro* fertilization. Free radicals. Oxidative stress. Caspases. Endonucleases. Chemotherapy. Ionizing radiation.

INTRODUCCIÓN

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término, tanto *in vivo* como *in vitro*. La presencia en el embrión de ciertas modificaciones en los nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del ADN pro-

cedentes del complemento genómico paterno (que no hayan sido reparadas por el ovocito después de la fertilización), es incompatible con un desarrollo embrionario y fetal normal.

En la actualidad se estima que un 40% de las causas de infertilidad masculina son de origen idiopático. Este porcentaje sería incluso más alto en parejas que acuden a clínicas de reproducción asistida. La etiología de algunas de estas causas podría estar relacionada con daño de ADN en los espermatozoides. Sin embargo, este daño se podría reparar por el ovocito después de la fecundación. Esto va a depender, sobre

Correspondencia: Dr. J.G. Álvarez.
Centro ANDROGEN.
Fernando Macías, 8, 1.º C. 15004 La Coruña. España.
Correo electrónico: informacion@androgen.es

todo: *a*) de la calidad citoplasmática y genómica del ovocito, y *b*) del grado de daño en las cadenas de ADN del espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Dado que la capacidad del ovocito de reparar este tipo de daño disminuye con la edad y que, al mismo tiempo, el grado de fragmentación de ADN en los espermatozoides aumenta, ello podría explicar, al menos en parte, la disminución significativa en la tasa de embarazo que se observa en parejas de edad avanzada. Este tipo de daño en las cadenas de ADN podría encontrarse en embriones con un complemento cromosómico normal. Es decir, la presencia de daño de ADN no reparado por encima de un umbral crítico en embriones generados, tanto *in vivo* como *in vitro*, podría explicar el paro en el desarrollo embrionario que se produce tras la implantación de embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa a partir del día 3 de desarrollo embrionario y se ha caracterizado como *late paternal effects*¹.

Cabría puntualizar que el daño de ADN que pudiera encontrarse en el embrión no tiene por qué estar exclusivamente relacionado con el daño de ADN en el espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Este daño podría provenir también del ovocito o de ambos. Sin embargo, dado que: *a*) el análisis de fragmentación de ADN en gametos es destructivo; *b*) este daño podría variar de un ovocito a otro, y *c*) el número de ovocitos es limitado, esto no nos ha permitido estudiar, hasta ahora, la presencia de esta patología en ovocitos. En cambio, el uso de tests que permitan el estudio del grado de fragmentación de ADN (especialmente cuando se trata de daño de ADN de cadena doble) en células del trofoectodermo de blastocistos, podría aplicarse al estudio de la integridad de la cromatina embrionaria. El uso combinado de reacción en cadena de la polimerasa y del estudio de aneuploidías en embriones en día +3 y de fragmentación de ADN en células del trofoectodermo en los blastocistos resultantes nos permitiría estudiar de forma simultánea la presencia de enfermedades monogénicas, aneuploidías y el grado de fragmentación de ADN en el embrión, lo que permitiría seleccionar los embriones de mejor calidad genómica.

MECANISMOS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES

¿Cómo se produce la fragmentación de ADN en los espermatozoides? El daño de ADN en los espermatozoides puede afectar tanto el ADN mitocondrial como el nuclear, y puede ser inducido por 5 mecanismos principales: *1*) apoptosis durante el proceso de

espermatogénesis; *2*) roturas de ADN o “nicks” producidos durante el remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis; *3*) fragmentación de ADN a nivel posttesticular inducida por radicales libres (ROS) y caspasas/endonucleasas durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo; *4*) fragmentación de ADN inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas, y *5*) fragmentación de ADN inducida por radio y quimioterapia. De estos 5 mecanismos, quizás el que juega un papel más importante sea la fragmentación de ADN a nivel posttesticular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto viene avalado por estudios previos que demuestran que la fragmentación de ADN es más alta en espermatozoides del epidídimo² y eyaculados^{3,4} que en espermatozoides testiculares⁵.

Inducción de apoptosis durante el proceso de espermatogénesis

Durante el proceso de espermatogénesis tiene lugar un cribado celular importante que resulta en la inducción de apoptosis en un 50-60% de las células germinales que entran en la meiosis I. Estas células *earmarked* con marcadores apoptóticos tipo *Fas* deberían ser fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli a la que se encuentran asociadas⁶⁻⁸. Sin embargo, esto no siempre va a ocurrir, y un porcentaje variable de estas células germinales entran en el proceso de remodelado celular de la espermiogénesis (que es el que determina la morfología espermática) y posteriormente aparecen en el eyaculado. En relación con este proceso de cribado fallido, los resultados de un estudio reciente sugieren que hay una disociación entre la calidad genómica de la célula germinal y el remodelado espermático que tiene lugar durante la espermiogénesis⁹. Es decir, una célula germinal puede tener el núcleo “pulverizado” por apoptosis o ser aneuploide y, sin embargo, el espermatozoide resultante tener una morfología normal. De ahí que cuando se microinyecte un espermatozoide de morfología normal, esto no nos garantiza que el genoma sea normal. Lo que sí se ha constatado es que cuando hay oligospermia, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal sea aneuploide es mucho mayor que si hay normozoospermia⁹. Probablemente esto esté relacionado con un bloqueo madurativo parcial asociado a alteraciones meióticas. Por último, el hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides en el eyaculado expresa marcadores apoptóticos del tipo de *Fas*, *fosfatidilserina*, *Bcl-X_L*, *p53*¹⁰ podría utilizarse para seleccionar espermatozoides no apoptóticos en muestras de semen. Un método desarrollado recien-

temente en esta dirección es el utilizado para separar espermatozoides apoptóticos de espermatozoides no-apoptóticos mediante el uso de las columnas de Annexin-conjugated MicroBeads (ANMB Microbead Kit, Miltenyi Biotec, Germany). El principio en el que están basadas estas columnas es que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilsíserina en la hemícapa externa de la membrana y se unen a la anexina V. Al aplicar un campo magnético a las columnas, los espermatozoides unidos a la anexina V conjugada con las micropartículas magnéticas serían retenidos en la columna, mientras que los no-apoptóticos pasarían a través de ésta¹¹. Otro método, quizás más específico, sería la selección de espermatozoides apoptóticos por técnicas de inmunoadsorción fase sólida mediante el uso de anticuerpos *anti-Fas* adheridos a placas de poliestireno.

Roturas de ADN durante el proceso de espermiogénesis

Alteraciones en el proceso de remodelado de la cromatina espermática durante la espermiogénesis podrían resultar en fragmentación de ADN. McPherson y Longo¹²⁻¹⁴ han postulado que la presencia de roturas en el ADN podría ser indicativa de maduración incompleta durante la espermiogénesis. Para que se produzca el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y liguen el ADN durante su protaminación. Estos cortes proporcionarían una liberación de estrés torsional ayudando así al empaquetamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas. Alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en roturas de ADN no reparadas. Estas alteraciones se producirían antes de la espermiación.

Fragmentación de ADN a nivel postesticular: daño oxidativo

Estudios recientes demuestran que espermatozoides inmaduros que producen valores elevados de ROS pueden inducir daño de ADN en espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la comigración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimos⁴. Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto en el epidídimos, y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, esto facilitaría el que los ROS induzcan fragmentación de ADN en el epidídimos, ya sea actuando directamente sobre el ADN o bien indirectamente mediante la activación de endonucleasas y cas-

pasas espermáticas. Esto es consistente con el hecho de que la cocentrífugación de espermatozoides inmaduros (que producen valores elevados de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la inducción de fragmentación de ADN en estos últimos, ya que en estas condiciones estos espermatozoides también se encontrarían en íntimo contacto¹⁵. Esto también es consistente con el hecho de que la exposición *in vitro* de espermatozoides maduros a ROS resulta en daño significativo de ADN^{16,17}.

Por otra parte, el mismo epidídimos podría jugar también un papel activo a la hora de inducir fragmentación de ADN en los espermatozoides a su paso por él, ya sea producido por radicales libres como el anión superóxido¹⁸, el radical hidroxilo o el óxido nítrico, o bien mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por agentes tóxicos o por factores epididimarios. En el primer caso, este tipo de daño podría prevenirse mediante el uso de agentes antioxidantes, mientras que en el segundo caso este tratamiento carecería de eficacia. Esto viene avalado por los resultados recientemente publicados por Greco et al⁵, donde el uso de antioxidantes produce una reducción significativa en los niveles de fragmentación de ADN.

Probablemente, los espermatozoides que expresen un mayor daño de ADN sean los que adquieran un menor grado de *crosslinking* de puentes disulfuro en la cromatina espermática durante su maduración en el epidídimos. En este sentido, estudios recientes han demostrado que, en general, el grado de fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados es más alto que en espermatozoides testiculares^{2,5} y que en espermatozoides del cuerpo y cabeza del epidídimos (que es donde se completa el proceso de *crosslinking*) y que la inducción de fragmentación de ADN en los espermatozoides a su paso por el epidídimos podría estar relacionada con la calidad genómica del espermatozoide. Es decir, además del mecanismo de cribado de la célula de Sertoli, al que se hacía referencia antes, habría otro mecanismo de cribado en el epidídimos dirigido a eliminar espermatozoides genómicamente defectuosos¹⁹.

El daño potencial de ADN que los espermatozoides pueden experimentar a su paso por el epidídimos tiene una gran trascendencia clínica, ya que en casos de valores elevados de fragmentación de ADN en semen y fallo en 2 o más ciclos de fecundación *in vitro* (FIV)/ICSI (*intra-cytoplasmatic sperm injection*), podría recurrirse a la microinyección de espermatozoides testiculares obtenidos mediante técnica de TESA (*testicular sperm aspiration*) o TESE (*testicular sperm extraction*) (preferiblemente TESA, dado que es menos invasiva y gozaría de una mayor aceptación por parte del paciente y del ginecólogo). Esto viene avalado por los resultados obtenidos en un estudio publicado por

Greco et al³, donde la microinyección de espermatozoides testiculares en pacientes con un valor de fragmentación de ADN en semen > 15%, medido por el test TUNEL (TdT-mediated-dUTP Nick-End Labelling), resultó en una tasa de embarazo del 44,4%, mientras que con espermatozoides eyaculados la tasa de embarazo fue del 5,4%.

Estudios recientes confirman los resultados de Greco et al, ya que se ha encontrado que las tasas de embarazo en ciclos de TESA-ICSI en parejas con fallo repetido de embarazo y una fragmentación de ADN en semen > 20%, determinada por TUNEL y citometría de flujo, son de un 64,7% (Toro et al, congreso de ASEBIR, Bilbao, 2007, resultados no publicados). Cabe destacar que el 98% de los embarazos se produjeron en el primer ciclo de TESA-ICSI y que el 70% de las parejas ya habían realizado ciclos previos de donación de ovocitos. La prevalencia de fragmentación de ADN patológica en estas parejas era del 40%. Esto es consistente también con los resultados de Barros et al, donde las tasas de embarazo en ciclos de TESE-ICSI en parejas con fallo repetido de embarazo, en las que no se había realizado estudio de fragmentación de ADN, son del 30% (Barros et al, resultados no publicados). Estos resultados sugieren que las tasas de embarazo observadas en el estudio de Toro et al, se deben a una fragmentación de ADN patológica y no al mero uso de espermatozoides testiculares. De hecho, la tasa teórica de embarazo predicha en la población general de parejas con fallo repetido de embarazo, sin realizar estudio de fragmentación de ADN, debería ser del $70\% \times 0,4 = 28\%$, muy similar a la tasa de embarazo del 30% encontrada por Barros et al.

Cabe destacar que la fragmentación de ADN inducida por el radical hidroxilo resulta en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina en un primer estadio seguido de fragmentación de ADN de cadena doble²⁰. Mientras que el daño de ADN del primer tipo se pudiera reparar por el ovocito, la fecundación de un ovocito por un espermatozoide con fragmentación de ADN de cadena doble es prácticamente irreversible e incompatible con el desarrollo de un embarazo a término. Dado que valores de fragmentación de ADN en espermatozoides eyaculados > 20%, medidos por TUNEL²¹, o > 30%, medidos por el test SCSA (*sperm chromatin structure assay*)²², están asociados a tasas de embarazo < 5%, la pregunta que surge es, ¿qué ocurre con el 80 y 70% restante de los espermatozoides? En estos casos, la probabilidad de que un espermatozoide con un ADN normal fecunde al ovocito debería de ser del 80 y 70%, respectivamente, y no < 5%. Sin embargo, además de que un 20 y 30% de los espermatozoides tengan roturas en las cadenas de ADN, el resto de los espermatozoides podría

tener modificaciones en las bases de ADN del tipo de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina. Por lo tanto, la probabilidad de que un espermatozoide con ADN normal fecunde al ovocito sería mucho más baja que la esperada con un valor de fragmentación de ADN del 20 o 30%, respectivamente. Es decir, además de la fragmentación de ADN measurable del 20 y 30% (*daño primario*), el 80 y 70% restante de los espermatozoides tendrían otro tipo de daño (*daño secundario*) que no miden los tests habituales de fragmentación de ADN y que, de no ser reparado, no es compatible con el desarrollo de un embarazo a término. Este concepto ha sido designado como el “efecto iceberg”²³.

Activación de caspasas y endonucleasas espermáticas

La activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados causada por factores fisicoquímicos, puede inducir también fragmentación del ADN espermático. Estudios previos indican que la exposición de espermatozoides de ratón *in vitro* a 40 °C resulta en un aumento significativo en el grado de fragmentación del ADN²⁴. Más recientemente, se ha demostrado la inducción de fragmentación de ADN en espermatozoides de ratón *in vivo* tras haber expuesto los testículos a una temperatura de 42 °C^{25,26}. Dado que la fragmentación de ADN se encontró en espermatozoides aislados del epidídimo 1 h después del estímulo, los autores concluyeron que el daño observado tendría que haberse producido en los espermatozoides a su paso por el epidídimo y que podría ser causado por radicales libres o por activación de caspasas y endonucleasas espermáticas.

Fragmentación de ADN inducida por radio y quimioterapia

El uso de agentes quimioterápicos y radioterapia puede inducir también fragmentación del ADN espermático. De hecho, el mecanismo principal a través del cual la radiación ionizante produce daño celular es por fragmentación de ADN de cadena doble y oxidación del ADN por daño secundario mediado por el radical hidroxilo.

TESTS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Recientemente se han introducido una serie de tests para la determinación de daño de ADN en los espermatozoides. Estos tests incluyen, TUNEL²⁷, COMET²⁸, CMA₃²⁹, *in-situ nick translation*³⁰, DBD-FISH (DNA Breakage Detection Fluorescence In

Situ Hybridization [detección de roturas en el ADN por hibridación in situ]³¹, Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD)³² y Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)^{22,23,33-37}.

Un aspecto importante en la determinación de la fragmentación de ADN es el relacionado con el tipo de roturas que se produce en las cadenas de ADN (cadena sencilla frente a cadena doble) y la susceptibilidad a la fragmentación de ADN. Tests de fragmentación de ADN como el SCSA, SCD³² o COMET a pH ácido o alcalino^{38,39} requieren un paso inicial de desnaturización para detectar los fragmentos de ADN o roturas potenciales en la cadena de ADN. De hecho, cuando se observa daño de ADN en condiciones de pH ácido o alcalino y no en condiciones de pH neutro se habla de puntos lábiles de rotura al tratamiento ácido o alcalino. Por el contrario, el test TUNEL²⁷, *in situ-nick translation* (ISNT)²⁷ y el COMET a pH neutro³⁸, no requieren un paso previo de desnaturización y miden roturas reales de ADN, tanto de cadena sencilla (ISNT, TUNEL y COMET) como de cadena doble (TUNEL y COMET).

Dado que el pH intracelular en el ovocito es de 7,0, roturas de ADN de cadena sencilla o la presencia de puntos lábiles de rotura en el ADN no tendrían mayores consecuencias en la formación del pronúcleo masculino, ya que a pH neutro las cadenas de ADN no se disocian y, por lo tanto, este tipo de daño sería mucho más fácil de reparar. Por lo tanto, como una primera aproximación, podrían considerarse 2 tipos de test: *a)* tests que miden “daño real” de ADN, como TUNEL, ISNT o COMET a pH neutro, y *b)* tests que miden “daño potencial” de ADN o puntos lábiles de rotura al tratamiento ácido o alcalino y susceptibilidad a la desnaturización de ADN, como SCSA, SCD, Chromomycin A3 y COMET a pH ácido o alcalino³⁹. Tests que miden daño real de ADN deberían tener un mayor valor predictivo que tests que miden daño potencial de ADN. Esto está avalado por el estudio publicado por Greco et al³, en el que se demuestra que la microinyección de espermatozoides eyaculados con valores de TUNEL > 15% resultaron en una tasa de embarazo por ciclo del 5,6%, mientras que la microinyección de espermatozoides testiculares con valores < 6% en un segundo ciclo de ICSI en estos mismos pacientes resultó en una tasa de embarazo por ciclo del 44,4%.

Es importante resaltar que, si bien el test TUNEL con frecuencia se utiliza para determinar la apoptosis celular, la positividad de TUNEL no es siempre sinónima de apoptosis, ya que el daño de ADN inducido por el radical hidroxilo y la radiación ionizante también resulta en fragmentación de ADN de cadena doble que se puede detectar por el test TUNEL⁴⁰.

El test de fragmentación de ADN que más se ha estudiado hasta ahora desde el punto de vista clínico es el test SCSA desarrollado por Evenson et al^{22,23,33-37}. El test SCSA mide la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturización in situ tras la exposición a un pH ácido. El ADN de espermatozoides con una cromatina normal no se desnaturiza, mientras que si el ADN de los espermatozoides está dañado y contiene roturas en sus cadenas se pueden alcanzar diferentes grados de desnaturización. Para determinar el grado de desnaturización del ADN espermático, tras el tratamiento ácido, se tiñen las células con naranja de acridina (AO). Dado que el AO es un fluorocromo metacromático, éste emite en verde cuando se intercala en cadenas de ADN dobles (ADN intacto), y en rojo si son de cadena sencilla (es decir, ADN fragmentado). El grado de daño de ADN, es decir la intensidad de la fluorescencia verde y/o roja en los espermatozoides se mide de forma cuantitativa por citometría de flujo y se expresa como DFI (ADN Fragmentation Index). Estudios previos indican que valores de DFI > 27% están asociados con fallo de embarazo en técnicas de reproducción asistida (TRA)^{41,42}. Sin embargo, estudios recientes ponen en tela de juicio el valor predictivo del test SCSA, ya que se han reportado casos de embarazo en técnicas de reproducción asistida con valores de DFI > 27%^{43,44}.

Quizás en la mayoría de los casos el daño de cadena sencilla detectado en el ADN espermático por tests como el test SCSA no sea incompatible con una descondensación normal de la cromatina durante el proceso de fecundación del ovocito y la formación del pronúcleo masculino. En este sentido, el recién desarrollado test SCD nos puede ayudar a comprender mejor este proceso. El test SCD está basado en el hecho de que en espermatozoides con las cadenas de ADN intactas se produce un desenrollamiento de los bucles de ADN, empaquetados en la matriz nuclear, tras haber sido expuestos a un tratamiento ácido seguido de un tratamiento con agentes reductores y detergentes. Este desenrollamiento produce un halo alrededor de la matriz nuclear que se puede visualizar por microscopía de campo claro usando tinciones habituales, como el Diff-Quik. Por el contrario, si una de las cadenas de ADN está dañada no se produce el halo, y se observan núcleos condensados. Sin embargo, si los espermatozoides no se exponen a este tratamiento ácido previo, se produce el desenrolamiento de los bucles de ADN, independientemente de que el ADN esté fragmentado o no. Dado que, como ya se ha indicado antes, el pH intracelular del ovocito es del orden de 7,0, un espermatozoide con ADN fragmentado que haya fertilizado el ovocito podría desenrollar sus bucles de ADN permitiendo que se produz-

ca la descondensación de la cromatina y la formación del pronúcleo masculino.

Sin embargo, todavía cabría preguntarse, ¿qué ocurre con ese pronúcleo masculino en el cual hay cadenas de ADN potencialmente dañadas, va a afectar al desarrollo posterior del embrión? Obviamente, la respuesta a esta pregunta va a depender de varios factores, entre los que cabe destacar el número de ovocitos obtenidos, la capacidad del ovocito para reparar este daño, si hay daño real o daño potencial y de si están afectados intrones o exones. Dado que más del 90% del genoma humano está compuesto por intrones con secuencias repetitivas que no codifican por proteínas celulares, lo más probable es que, de haber daño en las cadenas de ADN, éste no afecte a *hot spots* o secuencias que codifican proteínas (exones) que pudieran comprometer el desarrollo normal del embrión. Acerca de este tema se volverá a hablar más adelante en la sección de preguntas y respuestas.

Dadas las limitaciones de tests como el SCSA y SCD, que miden susceptibilidad del ADN a la desnaturización in vitro, en la predicción de tasas de fecundación y embarazo en técnicas de reproducción asistida, en la actualidad se recomienda el uso de tests como TUNEL o *in-situ nick translation* que miden “daño real” de ADN. La presencia de daño de cadena doble en el espermatozoide podría interferir de forma significativa con la descondensación de la cromatina espermática. Esto es consistente con los resultados de estudios que demuestran la existencia de bajas tasas de fecundación asociadas a valores de fragmentación de ADN > 10% medidos por el test TUNEL^{45,46}. Sin embargo, como cabría esperar, el test SCSA no se correlaciona con las tasas de fecundación in vitro^{41,42}.

APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD

¿Cuáles son las implicaciones del daño de ADN en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad? La fecundación de ovocitos en metafase II por espermatozoides con daño de ADN podría conducir a alteraciones en el desarrollo del embrión, fallo en la implantación, o a un aumento en la tasa de aborto^{15,23,47-49}. Ovocitos maduros con los mecanismos de reparación de ADN intactos tienen la capacidad de reparar un daño moderado de ADN en los espermatozoides^{50,51}. Sin embargo, ovocitos inmaduros u ovocitos cuyos mecanismos de reparación no funcionen de forma adecuada (p. ej., mujeres de edad avanzada) o que hayan sido dañados por factores tóxicos endógenos (p. ej., radicales libres) o exógenos (p. ej., radiación, tóxicos ambientales) no serían capaces de reparar este daño. Esto es consistente

con la observación de que la inseminación de ovocitos de mujeres de edad avanzada (que previamente habían sido inseminados in vitro en varios ciclos con espermatozoides de baja calidad de su cónyuge y cuya transferencia resultó en fallo repetido de embarazo con espermatozoides de donante), frecuentemente resulta en un aumento significativo en la calidad embrionaria y en la tasa de embarazo^{47,52}. Por consiguiente, los tests de fragmentación de ADN potencialmente se podrían utilizar en el diagnóstico de fallo repetido de embarazo y abortos de repetición en TRA.

Otro aspecto importante de las implicaciones clínicas del estudio de la integridad del ADN espermático está relacionado con el grado de fragmentación de ADN que se encuentra en espermatozoides testiculares frente a espermatozoides del epidídimo en oligospermias y azoospermias obstructivas². En este estudio, Steele et al² demostraron que el grado de fragmentación de ADN en espermatozoides testiculares de pacientes con procesos obstructivos es significativamente inferior al de espermatozoides del epidídimo obtenidos de esos mismos pacientes. Estudios previos sugieren que factores tóxicos medioambientales, radicales libres producidos por espermatozoides inmaduros, o bien derivados de un varicocele testicular o producidos por el propio epidídimo (p. ej., óxido nítrico producido por iNOS epididimaria), y/o la presencia de factores proinflamatorios (p. ej., interleucina [IL]-6, IL-8) podrían resultar en la inducción de fragmentación de ADN. Por lo tanto, en lugar de obtener espermatozoides de los túbulos epididimarios en casos de procesos obstructivos, donde se pueden acumular estos factores y también se puede producir una obstrucción iatrogénica, se recomienda obtener espermatozoides testiculares, ya sea por la técnica de TESA o TESE.

Como ya se indicó anteriormente, los resultados preliminares obtenidos por Toro et al, el estudio de fragmentación del ADN espermático mediante el test TUNEL y citometría de flujo en parejas con fallo repetido de embarazo, y un valor de fragmentación > 20% arrojan unas tasas de embarazo del 70% (García et al, 2007, resultados no publicados). Estos resultados, de confirmarse en una serie más amplia de casos, supondrían un gran avance en reproducción asistida.

También cabe destacar que el estudio de fragmentación de ADN tiene importantes aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de factor masculino en pacientes con varicocele. El estudio publicado por Smith et al⁵³ demuestra que un 50% de pacientes con varicocele tienen un valor patológico de fragmentación del ADN espermático medido por el test TUNEL, independientemente de que los parámetros seminales fuesen normales o anormales. La fragmen-

tación de ADN en estos pacientes se correlacionó con los valores de ROS en semen. En una segunda fase del estudio, se hizo un seguimiento a unos 18 pacientes con varicocele clínico y un valor de fragmentación del ADN espermático patológico, a los cuales se les había practicado una varicocelectomía. Los resultados demuestran que en más de un 90% de estos pacientes la fragmentación de ADN se normalizó 1 año después de la varicocelectomía (Smith et al, 2006, resultados no publicados). En un estudio similar, Werthman et al⁵⁴ encontraron que en pacientes con varicocele y un valor patológico de fragmentación de ADN, los valores de fragmentación de ADN se normalizaron tras la varicocelectomía en más del 90% de los casos. Por lo tanto, la fragmentación del ADN espermático podría utilizarse como marcador bioquímico para identificar a los pacientes con varicocele clínico que pudieran beneficiarse de la varicocelectomía.

INDICACIONES DEL ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

El análisis de fragmentación del ADN espermático estaría indicado solicitarlo en los siguientes casos:

1. Fallo repetido de embarazo en técnicas de reproducción asistida.
2. Abortos de repetición⁴⁹.
3. Edad del varón > 45 años^{55,56}.
4. Varicocele^{53,54} (Smith et al, 2006, datos no publicados).
5. Episodio de fiebre alta en los últimos 3 meses⁵⁷. Esto estaría relacionado con lo indicado anteriormente acerca del efecto de una temperatura escrotal elevada en el valor de fragmentación del ADN espermático.
6. Cuando se va a congelar semen antes de hacer una vasectomía. Dado que se ha demostrado que hay una cierta variabilidad en el valor de fragmentación del ADN espermático en muestras de semen obtenidas de un mismo paciente^{58,59}, cuando se vaya a congelar semen previo a una vasectomía deberían seleccionarse muestras de semen con valores de fragmentación de ADN normales.
7. Cuando se va a congelar semen previo a tratamientos de quimio/radioterapia. Aquí también se aplicaría lo indicado en el punto anterior.

FACTORES QUE PUEDEN CAUSAR FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Varios factores se han asociado a la inducción de daño de ADN en los espermatozoides. Estos factores inclu-

yen procesos inflamatorios agudos y crónicos, estrés oxidativo, varicocele, fiebre alta, exposición del testículo a temperaturas > 36 °C^{25,26}, tóxicos medioambientales, quimioterapia, radiación ionizante, edad > 40 años, consumo excesivo de cafeína (≥ 3 tazas de café al día)⁶⁰.

VALOR PREDICTIVO DE LOS TESTS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN

El valor predictivo de un test de fragmentación de ADN va a depender de varios factores. Estos factores incluyen:

– *Fragmentación de ADN de cadena sencilla frente a cadena doble.* Como ya se indicó anteriormente, en general, el daño de cadena sencilla es más fácil de reparar por ovocito que el de cadena doble.

– *Porcentaje de espermatozoides que están afectados.* Cuanto más alto sea el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado menor será la probabilidad de que un espermatozoide con ADN intacto pueda fecundar al ovocito.

– *Grado de fragmentación de ADN por espermatozoide.* Cuanto mayor sea el grado de fragmentación del ADN nuclear del espermatozoide, menor la será la probabilidad de que el ovocito lo pueda reparar.

– *Si únicamente hay daño primario o si hay daño combinado primario y secundario.* Por ejemplo, en casos de apoptosis durante la espermatogénesis o roturas de ADN producidas durante la espermiogénesis, generalmente este tipo de daño no suele estar asociado a daño secundario. Por el contrario, en casos de daño posttesticular inducido por el radical hidroxilo o en casos de exposición a radiación ionizante, el daño primario (que suele ser de cadena doble) casi siempre está asociado a daño secundario.

– *Tipo de test de fragmentación de ADN utilizado.* Tests que miden daño de ADN real como el test TUNEL o el COMET a pH neutro, en principio tienen un mayor valor predictivo que tests que miden daño potencial o susceptibilidad a la desnaturización del ADN como el COMET a pH alcalino o ácido, el test SCSA o el test SCD. De ahí que se recomiende el uso de tests como el test TUNEL.

– *Si el daño afecta intrones o exones.* Más del 90% del ADN está formado por intrones. Por lo tanto, la probabilidad de que el daño de ADN afecte a exones, que son las secuencias del ADN que codifican proteínas, es relativamente baja.

– *Capacidad del ovocito de reparar daño de ADN en el espermatozoide que lo ha fecundado.* Esta capacidad puede variar de un ovocito a otro en cohortes de ovo-

citos obtenidos en ciclos de in vitro. Desafortunadamente, la capacidad de reparación del ovocito no se puede determinar in vitro, ya que esto afectaría su viabilidad.

– *Capacidad del embrión para reparar el daño de ADN.* Esto va a depender del grado de daño de ADN introducido en el genoma embrionario por el genoma paterno y de la calidad embrionaria. A diferencia del caso del ovocito, en este caso sí se podría determinar la capacidad reparadora del embrión, al menos en parte, analizando la fragmentación de ADN en células del trofoectodermo obtenidas por biopsia de blastocisto.

– *Número de ovocitos en metafase II.* En ciclos de in vitro de parejas donde el valor de fragmentación de ADN en semen, medido por TUNEL, es relativamente alto, la probabilidad de que se produzcan embriones viables y un embarazo a término va a depender, al menos en parte, del número de ovocitos obtenidos y de su capacidad de reparar daño de ADN en el espermatozoide. Por ejemplo, si se dispone de 10 ovocitos en metafase II, la probabilidad de que se produzca un embarazo va a ser mayor que si se dispone de tan sólo 2 ovocitos. En este último caso, la probabilidad de que un espermatozoide con el ADN intacto fecunde un óvulo normal o de que un espermatozoide con ADN fragmentado fecunde un óvulo con una alta capacidad reparadora va a ser mucho menor que en el primer caso. Si bien en el primer caso, podrían producirse al menos 2 embriones con una puntuación de 10 (escala de 0 a 10), que podrían dar lugar a un embarazo evolutivo, esto no quiere decir que la fragmentación de ADN no esté asociada a un mal pronóstico en TRA, ya que de haber menos ovocitos, podría no producirse ningún embrión viable y, por lo tanto, no se produciría un embarazo. De hecho, aun cuando se produjesen 2 embriones de alta calidad, la calidad de los 8 embriones restantes podría estar comprometida y, por lo tanto, el uso de estos embriones en ciclos de *criotransfer* podría asociarse a malos resultados. Es decir, la tasa de embarazo por punción podría ser significativamente más baja. Por lo tanto, *el número de ovocitos disponibles es un factor importante que va a influir en el valor predictivo de tests de fragmentación de ADN.*

Esto mismo se aplicaría a ciclos de coito dirigido e IAC, donde el número de ovocitos que se obtienen habitualmente es de 1 o 2, respectivamente. Aquí las tasas de embarazo serían más bajas cuando el grado de fragmentación es relativamente alto, ya que habitualmente se desarrollan de 1 a 2 folículos. Por lo tanto, uno esperaría que el valor predictivo negativo de tests de fragmentación, especialmente los que miden daño real como el test TUNEL, sea más alto en ciclos de IAC y coito dirigido. Esto se ha confirmado en un

estudio donde se encontró una correlación significativa entre el grado de fragmentación de ADN en semen medido por el test TUNEL y las tasas de embarazo en ciclos de IAC⁵¹.

– *Procesamiento del semen.* Nos es inusual que durante el procesamiento del semen se pueda inducir daño iatrogénico del ADN espermático. Esto, por ejemplo, podría estar relacionado con la centrifugación de muestras de semen con una concentración relativamente alta de espermatozoides inmaduros productores de ROS y/o leucocitos, o también con la incubación innecesariamente prolongada a 37 °C de muestras de semen procesadas con un grado de estrés oxidativo elevado.

Para concluir, podríamos decir que el valor predictivo de un test de fragmentación, γ_{test} , es el sumatorio de varios factores: $\gamma_{\text{test}} = \gamma_{(1)} + \gamma_{(2)} + \gamma_{(3)} + \dots + \gamma_{(n)}$. Algunos de estos factores pueden medirse y otros no, por ejemplo si el daño afecta a intrones o exones o la capacidad reparadora del ovocito.

TESTS DE FRAGMENTACIÓN DE ADN RECOMENDADOS

Se recomienda utilizar tests que midan daño primario y daño secundario. Para determinar daño primario se recomienda el uso de tests de fragmentación que miden daño real, como el test TUNEL, ya sea por microscopía o por citometría de flujo. Los *kits* comerciales que hay para el test TUNEL son sencillos, poco costosos, permiten el uso de microscopía de campo claro o de fluorescencia, dependiendo de si la sonda va conjugada a peroxidasa o fluoresceína, respectivamente (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), y, por lo tanto, pueden realizarse en cualquier laboratorio. No se recomienda el uso de tests como el SCSA o el SCD, incluyendo el Halosperm kit, ya que estos tests miden daño potencial o susceptibilidad a la desnaturización del ADN y tienen un valor predictivo relativamente bajo en técnicas de reproducción asistida. Para medir daño secundario se recomienda la determinación de 8-OH-2'-deoxiguanosina utilizando el *kit* de ELISA de Oxford Biomedical (Oxford Biomedical Research, USA).

Bibliografía

1. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004;19:611-5.
2. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SEM. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod.* 1999;9:831-5.
3. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA

damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005;20:226-30.

- Ollero M, Gil-Guzmán E, López MC, Sharma RK, 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.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005;26:349-53.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod.* 1996;2:103-17.
- Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol.* 1999; 276:E310-6.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Revi Reprod.* 1999;4:31-7.
- Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, di Benedetto D, de Palma A, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod.* 2004;19:2298-302.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002;66:1061-7.
- Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* 2001;2:127-33.
- McPherson SMG, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev.* 1992;31:268-79.
- McPherson SMG, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA tropoisomerase II. *Devel Biol.* 1993;158:122-30.
- McPherson SMG, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 1993; 37:109-28.
- Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13:1864-71.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998;59:1037-46.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13:896-900.
- Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res.* 2006;2:1-10.
- Suganuma R, Yanagimachi R, Meistricht M. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatine during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod.* 2005;20:3101-8.
- Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J.* 2000;14:955-67.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Belau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005;20:3446-51.
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev.* 1999; 11:1-15.
- 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.
- Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl.* 1997;18:294-301.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of mild scrotal heat on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005;129:505-14.
- Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, DNA integrity and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev.* 2007; Epub ahead of print.
- 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.* 1993;53:945-51.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:613-9.
- Manicardi GC, Bianchi PG, 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.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, 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.
- Fernández JL, Vázquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, et al. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 2000;453: 77-82.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003;24:59-66.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility. *Science.* 1980;210: 1131-3.
- Evenson DP, Melamed MR. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* 1983;31:248-53.
- Evenson DP, Higgins PJ, Grueneberg D, Ballachey BE. Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry.* 1985;6:238-53.
- Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol.* 1991;5:115-25.
- Evenson DP, Jost, LK. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. En: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, editors. *Methods in cell biology.* Vol. 42. Flow Cytometry. Orlando: Academic Press; 1994. p. 159.
- Singh N, MacCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;15:1338-44.
- Singh N, Danner D, Tice R, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res.* 1989;184:461-70.
- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother.* 1998;52:252-8.
- Larson K, DeJonge C, Barnes A, Jost L, Evenson DP. Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Hum Reprod.* 2000;15:1717-22.
- 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.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004;19:1401-8.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004; 19:1409-17.
- 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.
- 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.

47. Genesca A, Caballín MR, Miró R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet.* 1992;82:181-6.
48. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoerilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril.* 1993;60:888-92.
49. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003;49:49-55.
50. Brandiff B, Pedersen RA. Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science.* 1981;211: 1431-3.
51. Matsuda Y, Tobari I. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light and methyl and ethyl methansulfonate. *Mutation Res.* 1988;198: 131-44.
52. Obasaju M, Kadam A, Sultan K, Fateh M, Munne S. Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embryos that result from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999;72:1113-25.
53. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Ríos R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod.* 2006;21:986-93.
54. Werthman P, Wixon R, Karpenson K, Evenson DP. Significant decrease in DNA fragmentation levels after varicocelectomy. *Fertil Steril.* 2007; Epub ahead of print.
55. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003;80:1420-30.
56. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim 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 USA.* 2006;103:9601-6.
57. Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl.* 2000;21:739-46.
58. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidan J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod.* 2006;21:2061-4.
59. Álvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL, Evenson DP. Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril.* 2004;81:712-3.
60. Schmid T, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod.* 2007;22:180-7.
61. Duran EH, Morschedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2003;17:3122-8.