

REVISIÓN

Incorporación del test de dispersión de la cromatina espermática al laboratorio andrológico



Juliana Cicaré^a, Aylen Avila^a, Adriana Caille^a y María José Munuce^{a,b,*}

^a Área Bioquímica Clínica, Laboratorio de Medicina Reproductiva, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

^b Reprolab - Sanatorio Británico de Rosario, Rosario, Argentina

Recibido el 7 de noviembre de 2015; aceptado el 10 de abril de 2016

Disponible en Internet el 13 de junio de 2016

PALABRAS CLAVE

Espermatozoide;
Humano;
Peróxido de
hidrógeno;
Test del halo;
Fragmentación;
ADN

Resumen

Objetivo: Desarrollar y poner a punto la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD) para evaluar el grado de fragmentación del ADN en semen.

Materiales y métodos: Se incluyeron 57 pacientes normozoospermicos (OMS 2010), los cuales fueron invitados a participar del estudio luego de firmar los consentimientos correspondientes. Se evaluó el grado de fragmentación mediante técnica de SCD, de manera objetiva y subjetiva, en muestras sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ y seleccionadas mediante swim up o gradiente de densidad, así como congeladas y descongeladas.

Resultados: La evaluación objetiva demuestra que la menor fragmentación se asociaría a un mayor tamaño del halo por definición, aunque se observa un aumento ($p < 0,05$) en el tamaño del núcleo. El tratamiento oxidante ($> 100 \mu\text{M}$ de H₂O₂) aumenta el índice de fragmentación de forma dosis-dependiente sin afectar la viabilidad ni la motilidad espermática. Las técnicas de selección de espermatozoides móviles evaluadas (swim up o gradiente de densidad) disminuyen el índice de fragmentación, aunque se observa cierta susceptibilidad individual. La congelación directa a -20°C permite diferir la realización del test, independientemente del tipo de muestra.

Conclusión: La evaluación subjetiva de la técnica SCD es suficiente para su uso en el laboratorio clínico, siempre que se evalúe la relación halo/núcleo para la clasificación. La utilización del tratamiento oxidante permite introducir un control positivo de daño para la puesta a punto de la técnica. La selección espermática mediante técnicas de uso habitual en reproducción asistida disminuye el índice de fragmentación, observándose cierta susceptibilidad individual. La técnica SCD puede ser diferida mediante congelamiento de la muestra, lo que permite un ahorro de insumos, reactivos y tiempo de procesamiento.

© 2016 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: slorenzo939@hotmail.com (M.J. Munuce).

KEYWORDS

Sperm;
Human;
Hydrogen peroxide;
Halosperm;
Fragmentation;
DNA

Incorporation of the sperm chromatin dispersion test to the andrological laboratory**Abstract**

Objective: To develop the sperm chromatin dispersion test (SCD) for evaluating the DNA fragmentation in semen.

Materials and methods: 57 normozoospermic (WHO 2010) patients were invited to participate in the study after signing the consents. DNA fragmentation was evaluated by SCD, objectively and subjectively, after oxidative stress with H_2O_2 and also in motile selected samples (swim up or density gradient), as well as in frozen and thawed samples.

Results: The objective assessment showed that minor fragmentation is associated to a larger halo size by definition, but also a significant increase in the size of the nucleus is observed. Oxidizing treatment ($> 100 \mu M$ of H_2O_2) increases the fragmentation index in a dose-dependent way without affecting sperm viability and motility. Different techniques of motile sperm selection (swim up or density gradients) decrease the fragmentation index with an individual susceptibility. Regardless of the sample (semen, suspension or post swim up direct freezing to $-20^\circ C$ allows to delay the test.

Conclusion: Subjective evaluation of the SCD test is sufficient for the clinical laboratory, evaluating the relation halo/nucleoid for the classification. To set up the SCD a dose-response curve with oxidizing treatment is required as a positive control of damage. The use of sperm selection methods used in assisted reproduction, decreases the fragmentation index, however individual susceptibility was observed. The SCD could be delayed by freezing the sample which allows saving of reagents and processing time.

© 2016 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La infertilidad humana afecta a un 15-20% de parejas, siendo la mitad de los casos de origen masculino¹. La integridad del ADN espermático es un prerrequisito para que ocurra la fecundación y transferencia de la información genética paterna. Las anomalías en el genoma masculino son un riesgo potencial para la fecundación y responsables de fallas en el desarrollo embrionario²⁻⁴. Si bien el espermograma tradicional es la mejor herramienta diagnóstica disponible para abordar el factor masculino, no detecta defectos a nivel genómico⁵. Un gran porcentaje de parejas no consiguen el embarazo, aun presentando espermogramas normales. La evidencia clínica indica que los espermatozoides de hombres infértiles con parámetros espermáticos normales poseen mayor daño en el ADN que los espermatozoides de hombres fértiles^{6,7}.

Se disponen de diferentes técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático: ensayo del COMETA⁸, de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)⁹, hibridación fluorescente in situ (DBD-FISH)¹⁰, marcado de extremos libres por dUTP (TUNEL)¹¹ y de traducción in situ de extremos libres (ISNT)¹². Todas requieren equipamiento y reactivos complejos, son costosas y poco prácticas¹². Actualmente se cuenta con el ensayo de dispersión de la cromatina (SCD), el cual es simple, rápido, reproducible, y permite evaluar la fragmentación del ADN espermático utilizando microscopía óptica^{13,14}.

El objetivo de este estudio fue mejorar la técnica SCD para aplicarla al laboratorio andrológico de rutina. Así, la lectura subjetiva fue comparada con la evaluación objetiva mediante microscopio óptico. Se evaluó el efecto de un

agente generador de daño oxidativo como control positivo, y el impacto de la selección de espermatozoides móviles, así como la congelación directa sobre el índice de fragmentación (IF), con la intención de diferir el momento de la evaluación.

Materiales y métodos

La comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario aprobó este proyecto. Cada paciente que fue invitado a participar firmó su consentimiento informado.

Análisis seminal y procesamiento inicial

Las muestras de semen de pacientes que concurren para evaluar su calidad seminal ($n = 57$) fueron analizadas y procesadas según normativas de la OMS⁵. Los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante swim up (SU) o gradiente de densidad (Gra), utilizando medio HamF-10 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia).

Test de dispersión de la cromatina (SCD)

El SCD se realizó de acuerdo a la técnica descrita previamente^{13,14}. Se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Promega, Madison, EE. UU.) 1% en agua y portaobjetos recubiertos con agarosa estándar (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, EE. UU.) 0,65% en agua. La suspensión de espermatozoides se mezcló con la agarosa de bajo punto de fusión y se depositó sobre los portaobjetos pretratados con agarosa. Los

preparados se expusieron 7 min a solución desnaturalizante (0,08 N HCl) y solución de lisis compuesta por 0,2 M dithiothreitol (Sigma Chemical Co, St. Louis, EE. UU.), 2,5 M ClNa (Merck, Darmstadt, Alemania), 0,2 M Tris (Promega, Madison, EE. UU.) y 1% Triton X-100 (Promega, Madison, EE. UU.) de pH 7,5, por 25 min a temperatura ambiente. Luego de fijados con etanol 70, 90 y 100%, fueron teñidos con solución de Wright (BIOPUR SRL, Rosario, Argentina).

Evaluación subjetiva

Se analizaron 5 muestras y se evaluaron 200 espermatozoides por duplicado en microscopio óptico (inmersión, 1.000×) y, para aceptar los replicados, se calculó la máxima diferencia aceptable según el intervalo de confianza centrado en 95% según OMS⁵. Se clasificaron según: a) halo grande, b) halo medio, c) halo pequeño, d) sin halo, y e) degradado^{13,14}. El IF se calcula como el porcentaje de c + d + e.

Evaluación objetiva

Se analizaron 5 muestras y se evaluaron 200 espermatozoides a partir de la digitalización de la imagen tomada con cámara fotográfica (Olympus, Tokio, Japón) en microscopio óptico (1.000×). Se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ (National Institute of Health <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular el diámetro (μm) menor del núcleo y el grosor del halo de los espermatozoides de cada uno de los patrones de fragmentación nombrados anteriormente.

Tratamiento oxidante

Para inducir estrés oxidativo, los espermatozoides móviles recuperados por SU ($5 \cdot 10^6$ esp/ml) fueron expuestos a H₂O₂ (50, 100, 200 y 300 μM) o medio (control: HamF-10) durante 30 min a 37 °C. Se realizaron controles de motilidad y viabilidad antes y después de cada tratamiento. Se analizó el IF y se determinó si el daño se asociaba a algún patrón específico de fragmentación. Se realizaron 6 experimentos completos.

Separación del plasma seminal

Se evaluaron distintas técnicas de selección de espermatozoides móviles, para determinar la fragmentación de ADN en las poblaciones recuperadas. Un grupo fue procesado mediante SU (n = 12) según se describió previamente. Otro

grupo fue procesado mediante Gra (n = 24), y para ello se prepararon las fracciones 90 y 50% a partir de la solución stock de SilSelect Stock (Fertipro, Beernem, Bélgica) y HamF-10 10×. En tubo cónico se depositaron capas 90-50% y por encima, el semen. Se centrifugó a 400 g durante 20 min. Posteriormente se descartaron el plasma seminal y la fracción de 50%, y se lavó la fracción de 90% con 2 ml de HamF-10 a 400 g por 10 min. Se evaluó el IF basal y luego de los tratamientos.

Procesamiento pre y poscongelación

Se procesaron 10 muestras según: semen (S), semen suspendido en PBS 1X (SS) y espermatozoides recuperados mediante SU (SU). Cada alícuota fue procesada como muestra en fresco y congelada a -20 °C durante al menos 2 días. Se analizó el IF antes y después del congelado.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizaron ANOVA, test de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons y test de Tukey. Para diferencias entre 2 valores se utilizó el test de Student. Los resultados se expresaron como media ± SEM, considerando significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Los pacientes (n = 57) exhibieron parámetros seminales superiores a los correspondientes al percentil 5.º, descriptos para una población fértil por la OMS⁵, presentando valores de volumen: $2,7 \pm 0,2$ ml; pH: $7,5 \pm 0,0$; concentración: $117,7 \pm 12,3 \times 10^6$ esp/ml; espermatozoides progresivos: $75,6 \pm 3,3\%$, vivos: $92,6 \pm 1,2\%$, y formas normales: $10,4 \pm 0,9\%$.

La evaluación objetiva permitió la medición del grosor del halo promedio en cada grupo, el cual por definición de patrones resultó mayor para «halo grande» respecto a los otros grupos ($p < 0,001$) (tabla 1). Sin embargo, el tamaño medio del núcleo del grupo considerado como «halo grande» también resultó superior ($p < 0,001$) a los otros grupos.

Se utilizó H₂O₂ para generar estrés oxidativo, sin efecto sobre la motilidad (> 88%) ni la viabilidad (> 93%) espermática. En presencia de concentraciones crecientes de oxidante, el IF aumentó en forma dosis-dependiente ($p < 0,001$) a partir de 100 μM (fig. 1). El aumento en el IF fue

Tabla 1 Diámetro del halo y diámetro menor del núcleo de espermatozoides procesados por la técnica SCD (n = 5)

	Halo grande	Halo medio	Halo pequeño	Sin halo	Degradado
Diámetro mínimo del núcleo (μm)	$14,7 \pm 0,6^a$	$10,0 \pm 0,5$	$10,6 \pm 0,3$	$9,9 \pm 0,3$	$7,4 \pm 1,0$
Grosor del halo (μm)	$19,6 \pm 0,9^b$	$6,3 \pm 0,4^c$	$2,1 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Los datos representan la media ± SEM.

^a Superior a los otros núcleos ($p < 0,001$).

^b Superior a los otros halos ($p < 0,001$).

^c Superior a los halos pequeño, sin halo y degradado ($p < 0,001$).

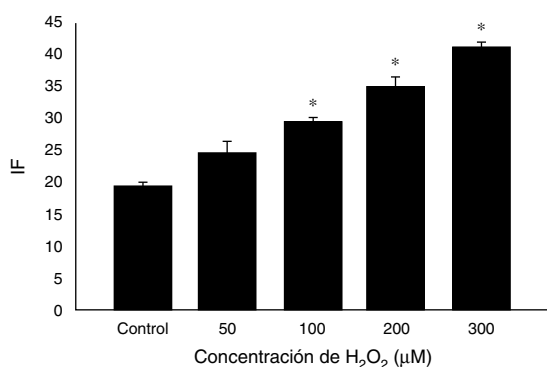


Figura 1 Efecto del H₂O₂ sobre el índice de fragmentación del ADN espermático. Se realizó la técnica de SCD luego de haber incubado los espermatozoides móviles durante 30 min a las distintas concentraciones de H₂O₂. Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 6). *p < 0,001 respecto del control.

a expensas del patrón «halo pequeño» (p < 0,05 para H₂O₂ 50 y 100 µM y p < 0,01 para H₂O₂ 200 y 300 µM respectivamente) (fig. 2). Más aún, a concentraciones de 300 µM también se observó un aumento significativo (p < 0,05) del porcentaje de espermatozoides con el patrón «sin halo».

Cuando se seleccionaron espermatozoides mediante SU o Gra, se observó una disminución significativa del IF tras la selección (p < 0,001) (fig. 3). Solo 4 de 12 pacientes (33%) para SU y 5 de 24 (21%) para Gra no mejoraron luego de la selección.

Al analizar el efecto generado al congelar las muestras, independientemente del tipo de muestra utilizada, encontramos que no hubo variación en el IF para basal versus poscongelado (tabla 2) (S, SS o SU; p > 0,05; n = 10). El control de estrés oxidativo, en todos los casos, generó un IF > 50%.

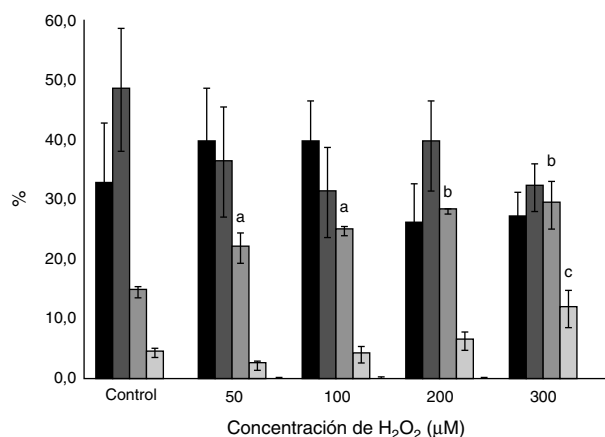


Figura 2 Efecto del H₂O₂ sobre los patrones de fragmentación del ADN espermático. Espermatozoides móviles fueron incubados 30 min a las distintas concentraciones de H₂O₂ y luego fueron procesados por la técnica SCD (■ halo grande; ■ halo medio; ■ halo pequeño; □ sin halo, y □ degradado). Los resultados se expresan como media ± SEM (n = 6). a) p < 0,05 respecto al control; b) p < 0,01 respecto al control; c) p < 0,05 respecto al control.

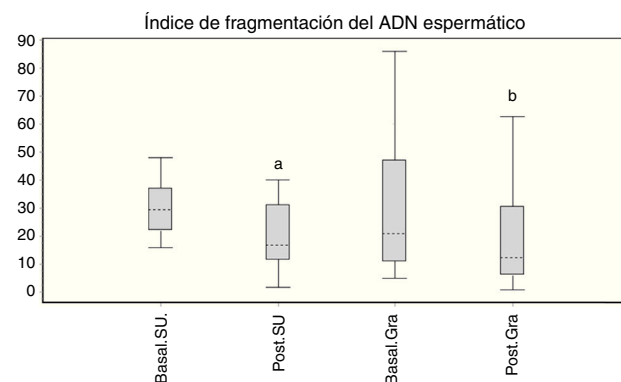


Figura 3 IF basal y postratamiento. Se realizó la técnica de SCD antes y después de seleccionar espermatozoides móviles mediante SU y Gra 90-50%. Se presentan los cuartiles para los diferentes tratamientos. SU: n = 12; p = 0,0014, respecto del basal y Gra: n = 24; p = 0,0003, respecto del basal.

Discusión

Se ha propuesto un valor de corte de IF del 30% por encima del cual las posibilidades de fecundación in vivo disminuyen marcadamente, acercándose a cero. Un valor superior al 30% no solo es perjudicial para la fecundación in vivo, sino también para la inseminación intrauterina (IIU)¹⁵⁻¹⁷, siendo en esos casos aconsejado el uso de técnicas de alta complejidad como FIV o ICSI^{18,19}. Por lo tanto, la evaluación del IF espermático tiene un alto valor predictivo, tanto para el éxito de la concepción natural, como para la elección de la técnica de reproducción asistida con mejores posibilidades de éxito. Existe un gran debate respecto a qué mide cada metodología disponible para evaluar el grado de fragmentación del ADN. En los métodos llamados directos (TUNEL, ISNT), las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, se marcan sobre el espermatozoide, evaluándose el daño «real» del ADN²⁰. Los métodos indirectos (SCD, SCSA, COMET) se basan en que las roturas del ADN incrementan la susceptibilidad a la desnaturalización que se inicia a partir de los extremos libres, por lo que se propone que estas técnicas miden el daño «potencial» del ADN⁹⁻¹². En la técnica de SCD, la decondensación se utiliza como una manera de medir la fragmentación, ya que el ADN fragmentado es el único que puede desnaturalizarse bajo las condiciones utilizadas en este método, generando ADN simple hebra (ADNss). Solo el ADN doble hebra (ADNds) (no fragmentado) puede ser decondensado, permitiendo la expansión de halos de dispersión^{21,22}. La técnica SCD consiste en el tratamiento de los espermatozoides con una solución desnaturalizante (ácida), la cual produce ADNss a partir del extremo de un fragmento de ADN roto. Si no está fragmentado, permanecerá como ADNds aún después del tratamiento con solución ácida. Posteriormente, los espermatozoides son tratados con una solución de lisis (con agentes reductores y detergentes) que rompe los enlaces disulfuro y remueve las proteínas del núcleo, permitiendo la decondensación del ADNds y el desenrollamiento de los bucles empaquetados en la matriz nuclear, provocando halos de dispersión. Sin embargo, el ADNss interactúa dentro de la cabeza del espermatozoide de manera tal que la remoción de las proteínas nucleares no provoca la dispersión del ADN (mecanismo desconocido).

Tabla 2 Índice de fragmentación del ADN espermático (n = 10)

	Semen (S)	Semen suspendido en PBS 1X (SS)	Móviles recuperados por swim up (SU)
Sin congelar (%)	36,3 ± 7,25	34,10 ± 4,93	18,50 ± 4,47
Poscongelado (%)	40,60 ± 6,28	44,00 ± 7,88	15,70 ± 3,03

Los datos representan la media ± SEM.

De esta manera, luego de la tinción, solo los espermatozoides con ADN intacto presentan halos de dispersión, mientras que no lo presentan aquellos con ADN fragmentado^{14,22,23}. La principal ventaja es que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color ni de intensidad de fluorescencia. Tampoco necesita de un equipo complejo ni personal especializado, y solo es necesario un observador entrenado²¹. En este trabajo se ha evaluado si la lectura objetiva tras la digitalización de la imagen, y medida micrométrica del grosor del halo y núcleo, mejora la microscopía tradicional. Cabe destacar que, si bien el grosor de los halos fue significativamente superior de acuerdo al criterio de evaluación propuesto, el tamaño del núcleo de los espermatozoides del grupo «halo grande» también resultó significativamente mayor ($p < 0,001$) respecto a los otros grupos. Esto podría deberse a que este patrón presenta la mayor dispersión de los bucles de ADN, por lo que su núcleo podría estar más esparcido que los núcleos de los otros patrones. Se han incorporado los sistemas computarizados de análisis del movimiento espermático al laboratorio andrológico de rutina, los cuales resultan muy útiles para evaluar el movimiento y la cinética espermática. El avance de estos sistemas al momento de evaluar el estado de fragmentación de ADN llevó a desarrollar programas para analizar los halos totales generados al evaluar la SCD. Aquí presentamos datos mostrando que el tamaño total del grupo «halo medio» se superpone con el clasificado como halo pequeño, por lo cual, si no se analizara la relación grosor del halo/núcleo en forma subjetiva, podríamos estar considerando espermatozoides dañados como «sanos». Así se estaría generando una subestimación del IF presente. Nuestros datos apoyan la importancia de la evaluación subjetiva, realizada por un operador entrenado, ya que no solo es necesario estimar el tamaño total del halo, sino también la relación entre el grosor de este y el núcleo.

Respecto a la inducción de daño, nuestros resultados mostraron un aumento dosis-dependiente en el IF con la concentración de H_2O_2 , siendo la fragmentación significativamente superior ($p < 0,001$) a partir de una concentración de H_2O_2 100 μM , sin que estén afectadas ni la viabilidad ni la motilidad espermática, a ninguna de las concentraciones planteadas. Estos datos concuerdan con los hallazgos de Aitken et al., quienes describen un aumento significativo ($p < 0,001$) en el daño del ADN utilizando dosis de H_2O_2 que varían entre 25 y 200 μM , alcanzando el 90% de fragmentación para la dosis mayor (200 μM)²³. Luego de la incubación de espermatozoides móviles 2 h a 37 °C en presencia de H_2O_2 10-200 μM , Duru et al. observaron un aumento dosis-dependiente en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado, siendo la fragmentación significativamente superior para las dosis más elevadas de H_2O_2 (100 y 200 μM)²⁴. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, estos investigadores notaron una disminución en

la motilidad espermática luego de la incubación. Esto podría deberse a que los espermatozoides permanecieron expuestos mayor tiempo al H_2O_2 (2 h) que lo realizado en nuestro modelo (30 min). Luego de la incubación de espermatozoides con concentraciones crecientes de nitroprusiato de sodio (otro agente oxidante) durante 1 h a temperatura ambiente, el grupo de Fernández et al. demostró un incremento dosis-dependiente del IF a expensas del patrón «halo pequeño» y «sin halo», coincidiendo con nuestros resultados¹⁴. Es de destacar que algunos colegas suponen que estos espermatozoides sin halo, en realidad presentarían un grado de dispersión tan extremo que no lo detectaríamos en el campo microscópico; sin embargo, no hay evidencia científica que avale esta suposición. Según el grupo de Fernández et al., el no incremento en el número de espermatozoides con patrón «degradado» podría deberse a que una fragmentación extrema no se produce por el ataque de los radicales, al menos inicialmente, y probablemente podría estar asociado a la degradación de la matriz nuclear¹⁴. La posibilidad de discriminar este daño extremo es una clara e importante ventaja de la técnica SCD, especialmente en pacientes que presentan varicocele, ya que esta patología parece promover la fragmentación del ADN espermático, de modo que el daño nuclear tiende a ser más marcado, con incremento del número de espermatozoides con patrón «degradado»²⁵. Esto podría deberse a un mayor tiempo de exposición a radicales libres generados por la acción del reflujo venoso anómalo.

La utilización de técnicas de reproducción asistida como IUI, FIV o ICSI requiere una selección previa de los espermatozoides. En este trabajo observamos que tanto el SU como el Gra seleccionan una subpoblación con menor IF, lo cual implicaría un mayor beneficio respecto a la población seleccionada. Sin embargo, existe alguna susceptibilidad individual que hace que algunos pacientes no mejoren sus parámetros por el tratamiento. Esto sugiere la necesidad de la evaluación en un ciclo previo respecto de posibilidades de recuperación y del grado de fragmentación postselección para así decidir, a priori, la mejor alternativa a ser utilizada el día del procedimiento asistido. A nivel terapéutico, en casos de altos niveles de fragmentación en semen ($> 30\%$) se propone separación magnética por columnas de anexina-V (MACS-magnetic-activated cell sorting). Este método se basa en que los espermatozoides dañados externalizarán en su membrana fosfatidilserina, la cual se une a microesferas metálicas cubiertas con anexina-V. Al pasar los espermatozoides por un campo magnético, se retienen los dañados, pasando libremente a través de la columna solo los no afectados²⁶. La utilización de esta metodología junto a ICSI reporta aparentemente buenas posibilidades de embarazo²⁷. Sin embargo, el efecto teratogénico del campo magnético no ha sido todavía completamente analizado, y su uso, aún hoy, resulta controvertido.

Por último, la posibilidad de congelar las muestras y procesarlas otorga una ventaja importante respecto al tiempo del operador, así como un aprovechamiento de los recursos por una reducción de reactivos al coleccionar las muestras y poder procesar varias el mismo día. Se observó que, independientemente de la muestra, el IF no se vio afectado por la congelación directa a -20°C . En conclusión, proponemos a la técnica de SCD como simple, estandarizable en laboratorios andrológicos, y que permite una relativamente sencilla incorporación al laboratorio de rutina.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este estudio fue parcialmente financiado por la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Autoría

Los autores son los únicos responsables por el contenido del texto y su preparación.

Conflicto de intereses

Los autores reportan no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Spira A, Multigner L. Epidemiology of infertility in 1998 — sperm density and environment. En: Flamigni M, Filicori C, editores. *Treatment of infertility: the new frontiers*. New Jersey: Communications Media for Education, Inc.; 1998.
2. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9:331–45.
3. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122:497–506.
4. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2008;89:823–31.
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, WHO Press, 5th ed., Switzerland: Geneva, 2010.
6. 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.
7. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospect study. *Fertil Steril*. 2002;78:313–8.
8. Hughes CM, Lewis SEM, 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.
9. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980;210:1131–3.
10. Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;82:251–6.
11. 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;53:1945–51.
12. Agarwal A, Allamaneni SSR. Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005;84:850–3.
13. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24:59–66.
14. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84:833–42.
15. Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev*. 1999;11:1–15.
16. Saleh RA, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, 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. 4: 1597–605.
17. 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.
18. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*. 2000;15:1717–22.
19. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperman 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.
20. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp*. 2007;31:120–31.
21. Fernández JL, Cajigal D, López-Fernández C, Gosálvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol*. 2011;682:291–301.
22. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL. Sperm chromatin dispersion (SCD) test: Technical aspects and clinical applications. En: Zini A, Agarwal A, editores. *Sperm chromatin: Biological and clinical application in male infertility and assisted reproduction*. New York: Springer; 2011. p. 151–70.
23. 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.

24. Duru KN, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2000;74:1200–7.
25. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl*. 2006;27:106–11.
26. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, et al. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*. 2005;10 Suppl. 6:740–6.
27. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2010;20 Suppl. 3:320–3.