

Asociación entre fragmentación del ADN espermático (túnel) y resultados obtenidos en ICSI

Anahí Belén D'Agostino,¹ Camila Andrea Frautschi,¹ Virginia Mercedes Maccari,¹ Fernando Beltramone,¹ Mariana Hernández,¹ Rosa Isabel Molina²

¹ Centro de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR) - Chacabuco 1089 - 1er Piso, Nva. Córdoba - Córdoba, Argentina.

² Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR) - Chacabuco 1123 - PB, Nva. Córdoba - Córdoba, Argentina.

Reproducción 2017;32:9-16

Resumen

Objetivo. Evaluar la relación entre la fragmentación del ADN espermático (TUNEL) y los resultados en ICSI. **Diseño.** Prospectivo de cohorte. **Intervención.** Ninguna. **Materiales y métodos.** Se estudiaron 72 ciclos de ICSI en mujeres ≤ 38 años utilizando eyaculado fresco procesado por gradientes. Se realizó TUNEL, morfología y madurez nuclear a esta muestra. Se dividió la población en TUNEL < 20% ($n = 44$) y TUNEL $\geq 20\%$ ($n = 28$) para comparar parámetros seminales y resultados de ICSI. Se utilizaron: coeficiente de correlación r o ρ , test t o Mann Whitney, Chi-cuadrado y curvas ROC para los análisis estadísticos. **Resultados.** El TUNEL mostró correlación inversa con madurez nuclear, volumen y total de espermatozoides móviles. El grupo TUNEL $\geq 20\%$ tuvo valores significativamente menores de morfología, madurez nuclear, volumen, movilidad y total de espermatozoides móviles. No hubo diferencias significativas entre TUNEL < 20% y TUNEL $\geq 20\%$ en fertilización total y normal (83% vs 86% y 74% vs 78%), embriones de buena calidad (73% vs 64%, $p = 0,056$), embarazo clínico (45% vs 33%) y embarazo clínico acumulado en curso (40% vs 44%). No se encontró un valor

de TUNEL que sea predictivo. **Conclusiones.** Los valores de TUNEL elevados correspondieron a muestras de menor calidad. No encontramos relación entre TUNEL y los resultados obtenidos en ICSI.

Palabras claves. TUNEL, ICSI, espermatozoides, fertilización, embarazo clínico.

Association between spermatic DNA fragmentation and results from icsi Summary

Objective. To evaluate the relationship between sperm DNA damage (TUNEL) and ICSI outcomes. **Design.** Prospective cohort study. **Intervention.** None. **Materials and methods.** Seventy-two ICSI cycles were studied. Women up to 38 years old and fresh ejaculated sperm processed by density gradients. TUNEL, morphology and nuclear maturity were assessed. Patients were divided into two groups: TUNEL < 20% ($n = 44$) and TUNEL $\geq 20\%$ ($n = 28$). Seminal parameters and ICSI outcomes were compared. R or ρ correlation coefficients, t -test or Mann Whitney, Chi-square test and ROC analysis were used for statistical analysis. $p < 0.05$ was considered significant. **Results.** TUNEL inversely correlated with nuclear maturity, volume and total motile sperm. The TUNEL $\geq 20\%$ group showed statistically significant lower values of sperm morpho-

Correspondencia: Anahí Belén D'Agostino
Tel: 0351 153848671
Correo electrónico: anahidagos@hotmail.com

*logy, nuclear maturity, volume, sperm motility and total number of motile sperm. No significant differences were observed between TUNEL < 20% and TUNEL ≥ 20% in total and normal fertilization rates (83% vs 86% and 74% vs 78%), good quality embryos (73% vs 64%, p = 0.056), clinical pregnancy (45% vs 33%) and ongoing accumulated clinical pregnancy (40% vs 44%). ROC analysis didn't show a different predictive TUNEL value. **Conclusions.** High TUNEL values were associated with lower quality semen samples. We didn't find a relationship between TUNEL value and ICSI outcomes.*

Key words. TUNEL, ICSI, spermatozoa, fertilization, clinical pregnancy.

Introducción

La infertilidad o subfertilidad por factor masculino involucra a un 40% de las parejas que consultan por tratamientos de reproducción asistida.¹ El éxito de las técnicas de reproducción asistida depende de numerosos factores, uno de ellos es la integridad del material genético de las gametas.

Algunos autores consideran que el grado de daño del ADN espermático es un biomarcador útil en el diagnóstico de la infertilidad masculina y en la predicción de resultados de reproducción asistida.^{1,2} Numerosos trabajos han reportado que cuando la fragmentación del ADN espermático es alta, las tasas de fertilización, la calidad y desarrollo embrionario, y las tasas de embarazo obtenidas mediante técnicas de reproducción asistida se ven afectadas de manera negativa.^{1, 3 - 5} Además, algunos autores plantean que el daño en el ADN espermático impactaría también en estadíos posteriores a la implantación, contribuyendo con mayores tasas de abortos espontáneos^{1, 6} y enfermedades en la descendencia.^{1, 7 - 9}

En la actualidad, el análisis rutinario del semen incluye parámetros seminales como: concentración, movilidad y morfología. Numerosos estudios han evaluado la relación entre estos parámetros y el daño en el ADN espermático, encontrando resultados contradictorios.^{10, 11} Algunos autores proponen que sería prudente incluir el estudio de fragmentación del ADN espermático de

manera rutinaria en el espermograma, y en base al resultado, guiar a los pacientes a un tratamiento más adecuado.^{1, 2}

Para estudiar la fragmentación del ADN espermático se han descrito varias técnicas como: SCSA (*Sperm chromatin structure assay*),¹² SCD (*Sperm chromatin dispersion test*),¹³ TUNEL (*deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling*),¹⁴ otros.

La técnica de TUNEL es una de las más utilizadas,² ya que es versátil; está comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. No obstante, en la literatura permanece en discusión el valor umbral de TUNEL a partir del cual se podría predecir de manera significativa un efecto negativo en la fertilidad natural y en los resultados de tratamientos de reproducción asistida de baja^{15, 16} y alta complejidad.^{1, 17}

En este trabajo nos propusimos: evaluar si existe relación entre la fragmentación del ADN espermático (medida mediante la técnica de TUNEL) y los resultados obtenidos luego de ICSI (inyección intracitoplásmica del espermatozoide) y determinar para nuestro laboratorio, el valor umbral de TUNEL a partir del cual podría afectar de manera significativa los resultados de ICSI.

Materiales y métodos

Población de estudio: el estudio se llevó a cabo en parejas que realizaron ciclos de ICSI durante los años 2014 y 2015, quienes accedieron a participar a través de un consentimiento informado. Los criterios de inclusión fueron: mujeres ≤ de 38 años, ausencia de endometriosis y poliquistosis ovárica (PCO), ciclos en los que se hubieran obtenido al menos 4 ovocitos maduros (MII), con semen propio eyaculado en fresco, no criptozoospermias y en los que no se hubiera realizado columnas de anexina.

Estimulación ovárica: la estimulación ovárica se realizó con esquema flexible de antagonista de GnRH. Se realizaron controles periódicos ecográficos y de estradiol sérico. Se aplicó el antagonista (Cetrorelix) con folículos ≥ a 14 mm. Cuando se alcanzó el desarrollo folicular de tres folículos de 18 mm o más, se administró 10.000 UI de HCG.

Procedimiento de laboratorio: el día de la as-

piración folicular, se analizó la muestra de semen en el laboratorio de biología. La abstinencia fue de 1 a 5 días. Luego de esperar la licuefacción de la misma, se evaluó: volumen, concentración y movilidad. Las muestras fueron procesadas mediante gradientes de densidad (*Isolate, Irvine Sc.*) y los espermatozoides móviles recuperados fueron resuspendidos en m-HTF+SSS (*Irvine Sc.*). Se dividió la muestra procesada en dos alícuotas, una para ICSI y otra para determinar TUNEL, morfología espermática (CE) y madurez nuclear. Dichos valores fueron obtenidos en paralelo al momento del ICSI (5-6 hs postaspiración). En todos los casos, los parámetros seminales se analizaron según normas OMS 2010.¹⁸

Para la determinación del valor de TUNEL, se utilizó el *kit In Situ Cell Death Detection Kit Roche*. La técnica de TUNEL utiliza procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos marcados, tales como la *Terminal dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL)¹⁹ Se consideró como valor de referencia un porcentaje de fragmentación < 20%.²⁰

Luego de la aspiración folicular, los ovocitos maduros recuperados se cultivaron en medio G-IVF plus (*Vitrolife*). Previo a la inyección de los mismos, se realizó la búsqueda de los espermatozoides por un tiempo variable (según la calidad de la muestra, 15 minutos a 2 horas), hasta elegir los mejores disponibles según su morfología y movilidad. Los ovocitos inyectados fueron ubicados en gotas individuales, en medio G-1 plus (*Vitrolife*). Luego de 17 ± 1 hs de la inyección, se evaluó la sobrevida y fertilización de los ovocitos. Los embriones fueron cultivados y evaluados durante 3 a 6 días en medios G-1 plus y G-2 plus (*Vitrolife*) hasta la transferencia y/o vitrificación de los mismos. Se consideraron *embriones de buena calidad en día 3* aquellos que presentaron: 6 células o más, ausencia de multinucleación en día 2 y hasta 20% de fragmentos.

Análisis de datos y estadística: el diseño de este trabajo fue de cohorte, comparativo. No se realizó ninguna intervención.

Se dividió a la población en dos grupos, según un valor de corte de TUNEL < 20% tomado de la bibliografía:²⁰ TUNEL < 20% y TUNEL ≥ 20%.

Las variables evaluadas en ambos grupos fueron: años de esterilidad de la pareja, edad de la mujer y del varón, FSH basal, cantidad de ovo-

citios maduros recuperados e inyectados. Se compararon los parámetros seminales de la muestra de semen original: volumen, concentración, porcentaje de movilidad y cantidad total de espermatozoides móviles. De la muestra ya procesada, se comparó el valor de TUNEL, morfología espermática (CE) y madurez nuclear.

Además, se evaluó la correlación entre los valores de TUNEL y dichos parámetros seminales.

Por último, se compararon entre los grupos los resultados de ICSI: fertilización total y fertilización normal / ovocitos inyectados; embriones clivados en día 2 / ovocitos fertilizados normalmente; embriones no multinucleados en día 2 / embriones clivados; embriones de buena calidad en día 3 / ovocitos fertilizados normales; porcentaje de embarazo bioquímico y clínico en fresco (pacientes con dos determinaciones de subunidad beta seriadas y crecientes, y ecografía con saco gestacional / pacientes transferidas); porcentaje de embarazo clínico acumulado (pacientes con embarazo clínico / pacientes transferidas en fresco y/o desvitrificados) y porcentaje de embarazo clínico acumulado en curso (embarazo clínico en curso / pacientes transferidas en fresco y/o desvitrificados).

Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico *Med Calc* (10.2.0.0). Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó el *test* de D'Agostino-Pearson para evaluar la normalidad de la distribución de las variables, y el *test t* de *Student* o el *test* de Mann Whitney (según la normalidad o no de los datos) para comparar los promedios y desvíos entre los grupos. Se utilizó el *test* Chi-cuadrado para comparar los porcentajes entre los grupos. Las correlaciones se realizaron mediante cálculo de coeficiente de correlación r de Pearson o ρ de Spearman (según la normalidad o no de las variables). Por último, se usaron curvas ROC para determinar un valor de corte de TUNEL que pudiera predecir resultados de ICSI.

Resultados

Se analizaron los ciclos realizados por 72 parejas: 44 pacientes (61%) tuvieron un TUNEL < 20% (10,4 ± 4,6) y 28 pacientes (39%) presentaron un TUNEL ≥ 20% (28,3 ± 6,7).

Los grupos fueron comparables en cuanto a

años de esterilidad, edad de ambos, FSH basal, número de ovocitos maduros recuperados e inyectados (Tabla 1).

Al comparar entre los grupos los parámetros seminales, excepto la concentración, todos resultaron significativamente mejores en el grupo TUNEL < 20% (Tabla 2).

De las correlaciones entre TUNEL y demás parámetros seminales, resultaron estadísticamente significativas e inversas: TUNEL y madurez nuclear ($\rho = -0,393$; $p = 0,001$, 95% IC: -0,573 a -0,178), TUNEL y volumen ($\rho = -0,271$; $p = 0,022$, 95% IC: -0,473 a -0,042) y TUNEL y total de espermatozoides móviles ($\rho = -0,359$; $p = 0,003$, 95% IC: -0,546 a -0,139). En cambio, no hubo correlación entre TUNEL y concentración espermática ($\rho = -0,169$; $p = 0,155$, 95% IC: -0,385 a 0,066), TUNEL y movilidad ($r = -0,341$;

$p = 0,003$, 95% IC: -0,531 a 0,119, ns) y TUNEL y morfología espermática (CE) ($r = -0,225$; $p = 0,058$, 95% IC: -0,433 a 0,008).

En cuanto a los resultados obtenidos luego de ICSI, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ningún parámetro evaluado (Tabla 3).

El porcentaje de embriones de buena calidad en día 3 fue mayor en el grupo de TUNEL < 20%, sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa ($r = -0,22$; $p = 0,056$, 95% IC: -0,435 a 0,006). Las tasas de embarazo en fresco y de embarazo acumulado no resultaron diferentes.

No pudimos encontrar mediante curvas ROC un valor umbral de TUNEL que pudiera predecir, para nuestro laboratorio, fertilización, porcentaje de embriones de buena calidad en día 3 o tasas de embarazo.

Tabla 1. Características de los pacientes en estudio.

	TUNEL < 20%	TUNEL ≥ 20%	p
N	44	28	
Esterilidad (años)	4,2±2,8	4,6±3,4	p = 0,911
Edad mujer	33,5±3,2	34,1±2,9	p = 0,38
Edad varón	34,8±3,7	35,8±3,8	p = 0,245
FSH basal	8±3,4	7,1±1,4	p = 0,277
Ovocitos MII recuperados	10,8±5,7	10,3±3,8	p = 0,95
Ovocitos MII inyectados	8,5±3,7	8,2±3,1	p = 0,819

Tabla 2. Parámetros seminales de la muestra usada para ICSI, en los grupos comparados en estudio.

	TUNEL < 20%	TUNEL ≥ 20%	p
N	44	28	
Morfología (%)	10,5 ± 4	7,3 ± 5,0	p = 0,0164
Madurez nuclear (%)	79,3 ± 17,1	69,3 ± 16,7	p = 0,0004
Volumen (ml)	3,2 ± 1,6	2,3 ± 1,6	p = 0,0062
Concentración (x10 ⁶ /ml)	8±3,4	66,3 ± 72,2	p = 0,4775
Movilidad (%)	67,3 ± 55,6	51,2 ± 20,2	p = 0,0082
Total móviles (x10 ⁶)	63 ± 16,4	68,7 ± 76,5	p = 0,0134

Tabla 3. Resultados obtenidos luego de ICSI en las pacientes de los grupos estudiados.

PACIENTES	44	28	p
Ovocitos inyectados	335	197	
Fertilización total	261 (83%)	158 (86%)	p = 0,448
Fertilización normal	235 (74%)	144 (78%)	p = 0,416
Clivados / 2pn	229 (97%)	140 (97%)	p = 0,843
Embriones no multinucleados en día 2 / clivados	194 (85%)	116 (83%)	p = 0,744
Embriones de buena calidad en día 3 / 2pn	172 (73%)	92 (64%)	p = 0,056
Transferencias en fresco			
Pacientes transferidas	33	21	
Embriones transferidos (x ± sd)	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.5	p = 0,716
Embarazo químico	18 (55%)	8 (38%)	p = 0,368
Embarazo clínico	15 (45%)	7 (33%)	p = 0,549
Resultados acumulados			
Pacientes transferidas (fresco+desvitrificados)	42	27	
Emb. clínico acumulado	19 (45%)	13 (48%)	p = 0,991
Emb. clínico acumulado en curso	17 (40%)	12 (44%)	p = 0,939

Discusión

En la población estudiada, el daño en el ADN espermático medido a través de la técnica de TUNEL correlacionó de manera significativa e inversa con algunos parámetros seminales (madurez nuclear, volumen y total de móviles). No hubo una correlación entre el TUNEL y la concentración, movilidad y morfología. Sin embargo, al comparar los valores de cada parámetro entre los grupos, las muestras de menor calidad fueron las que tuvieron valores de TUNEL más elevados (Tabla 2).

Los trabajos que estudiaron estas asociaciones presentan resultados muy variados, lo que refuerza la necesidad de seguir profundizando estos estudios. En lo que respecta a concentración y movilidad, las asociaciones encontradas por otros autores son diversas.^{11, 17, 21} Con respecto a la morfología,

numerosos autores han confirmado una correlación inversa y significativa con el daño del ADN espermático.^{2, 11, 22} No obstante, al igual que lo observado en este estudio, la mayoría de los trabajos coinciden en que las muestras de menor calidad son las que presentan un mayor daño en el ADN espermático.^{11, 21-23} Es bien conocido que la presencia de defectos en el material genético del espermatozoide (tales como anomalías en la condensación de la cromatina y en la integridad de la molécula del ADN o anomalías cromosómicas), se asocian estrechamente con la infertilidad.²⁴

A pesar de las diferencias significativas entre los grupos para los parámetros seminales, los resultados obtenidos luego de ICSI fueron comparables. Esto concuerda con lo encontrado por algunos au-

tores,²⁵⁻²⁹ incluso en estudios como el de Shir Dar y col (2013) con valores elevados de ADN fragmentado (> 50%).¹⁷ A su vez, resulta opuesto a lo planteado por otros autores, quienes encontraron una correlación inversa entre la fragmentación del ADN espermático y la tasa de fertilización, calidad embrionaria y tasa de implantación.^{30,31} Zhao y col (2014) no encontraron correlación con la tasa de embarazo, pero sí con mayores tasas de aborto en ciclos de ICSI.³² Otros autores han encontrado diferentes valores umbrales de TUNEL para predecir embarazo.^{25,33-35} En nuestro caso, no pudimos encontrar mediante curvas ROC, un valor de TUNEL que fuera predictivo de los resultados.

Las razones posibles para explicar la falta de asociación encontrada entre el daño espermático y los resultados de ICSI pueden ser varias. Por un lado, la población estudiada está integrada por mujeres jóvenes, de buen pronóstico reproductivo. En estas pacientes, los ovocitos tienen mayor capacidad de reparar los daños en el ADN espermático,^{17,36} lo cual podría atenuar el impacto de dicha alteración en los resultados.

La ausencia de correlación entre el TUNEL y los resultados de embarazo podría estar asociada, además, a la posibilidad tener un buen número de embriones para elegir y transferir.

Al realizar ICSI se eligen los espermatozoides de acuerdo a morfología y movilidad. Se ha demostrado que el daño en el ADN espermático se asocia, entre otras cosas, a morfologías descartadas durante la selección (tales como presencia de vacuolas, anomalías en la cabeza, residuos citoplásmicos, etc.) y a la movilidad anormal de los espermatozoides. De este modo, los mejores espermatozoides disponibles y seleccionados, no necesariamente son representativos de la población de espermatozoides en la que se mide el daño del ADN espermático.^{22,31,32,34,37,38}

Por otra parte, este estudio abarca estadios tempranos del desarrollo embrionario, desde fertilización a día 2 y 3. Se ha propuesto que los espermatozoides con ADN alterado pueden conservar el potencial de fertilizar al ovocito, producir embriones viables y lograr un embarazo.^{39,40} No obstante, la influencia del daño del ADN espermático podría influenciar de manera significativa estadios posteriores al día 3, cuando aumenta la transcripción del ADN del nuevo embrión.⁴¹ Esto

podría conducir a una disminución en la llegada a blastocisto, mayores tasas de aborto e incluso en enfermedades en la descendencia, a raíz de un efecto paterno tardío.^{6,25,32,39,42}

Teniendo en cuenta las limitaciones del presente trabajo, para confirmar nuestros resultados deberíamos realizar futuras investigaciones, aumentando el número de casos y ampliando los criterios de inclusión de la población en estudio, sobre todo en lo que respecta a la edad de ambos y a pacientes con baja respuesta. Además, sería valioso poder analizar el desarrollo a blastocisto, las tasas de aborto y realizar un seguimiento de los nacidos a partir de muestras con TUNEL elevado, para evaluar posibles problemas en la descendencia.

Por último, debemos destacar que es difícil comparar resultados entre laboratorios, debido a la variedad de técnicas usadas para medir el daño en el ADN y a la falta de estandarización de los protocolos y de los valores umbrales. Se ha reportado que pequeñas diferencias en los pasos de la técnica de TUNEL afectan la medición.^{32,43} A raíz de la variedad de estudios, técnicas, umbrales y resultados, se hace necesario que cada laboratorio analice la incidencia del daño del ADN espermático en su población y su relación con los resultados obtenidos.

Conclusión

Los valores de TUNEL más elevados correspondieron a muestras de menor calidad en cuanto a otros parámetros seminales. No encontramos relación entre TUNEL y los resultados obtenidos en ICSI. Esto podría explicarse por dos factores. Por un lado, dado que las mujeres evaluadas eran buen pronóstico, los ovocitos jóvenes podrían tener la capacidad de reparar el daño del ADN espermático. Este factor, sumado a la selección de los mejores espermatozoides durante el ICSI, podrían explicar la falta de asociación en los resultados.

Referencias

1. Lewis, S.E, Aitken, J R, Conner, S.J. y col. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online Review* 2013; 27: 325-337.

2. González Torres, M A, Rawe, V. Fragmentación del ADN espermático: su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente. *Reproducción* 2010; 25:185-191.
3. Tomlinson, M J Moffatt, O Manicardi, G C. y col. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod.* 2001; 16:2160-2165.
4. Lewis, S E, Aitken, R J DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; 322:33-41.
5. Agarwal, A Allamaneni, S S The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol.* 2004; 56: 235-245.
6. Zini A Boman, J M Belzile, E. y col. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2008; 23:2663-2668.
7. Bungum, M Bungum, L Lynch, K F. y col. Spermatozoa DNA damage measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) and birth characteristics in children conceived by IVF and ICSI. *Int. J. Androl.* 2012; 35: 485-490.
8. Ji B T Shu, X O Linet, M.S. y col. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89: 238-244.
9. Sawyer, D E; Aitken, R.J. Male mediated developmental defects and childhood disease. *Reprod. Med. Review* 2000; 8:107-126.
10. Henkel R Kierspel, E Hajimohammad, M y col. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online* 2003; 7:477-484.
11. I Sheikh, N Iraj, A, Marzieh, F y col. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Iran J. Reprod. Med.* 2008; 6:13-18.
12. Evenson, D P Darzynkiewicz, Z Melamed M R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 240: 131-133.
13. Fernández, J L Muriel, L Goyanes, V y col. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.* 2005; 84:833-42.
14. Gorczyca, W Traganos, F Jesionowska H y col. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 1993; 207: 202-205.
15. Bungum, M Humaidan, P Axmon, A y col. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007; 22:174-9.
16. Duran, E H; Morshedi, M.; Taylor, S. y col. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2002; 17:3122-8.
17. Shir Dar, M D Grover, S A, Moskovtsev, S I y col. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%). *Fertil Steril.* 2013; 100:75-8.
18. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Geneva: WHO Press Health Organization, 2010.
19. Chohan, K R Griffin, J.T; Lafromboise, M y col. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006; 27:53-59.
20. Sergerie, M Laforest, G Bujan, L. y col. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005; 20:3446-51.
21. Oosterhuis, G J E Mulder, A.B.; Kalsbeek-Batenburg, E. y col. Measuring apoptosis in human spermatozoa: A biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74:245-250.
22. Lavolpe, M Lorenzi, D Greco, E y col. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. *JBRA Assist. Reprod.* 2015; 19:70-74.
23. Shen, H M Dai, J Chia, S E y col. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.* 2002 17:1266-1273.
24. Aravindan, G R Bjordahl, J Jost, L K y col. Susceptibility correlated of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1997; 236:231-237.
25. Nuñez-Calonge, R Caballero, P López-Fernández, C y col. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod. Sci.* 2012; 11:1163-8.
26. Bungum, M. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 2004; 19:1401-1408.
27. Gandini, L Lombardo, F, Paoli, D y col. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum. Reprod.* 2004; 19:1409-1417.
28. Lin, M H, Kuo-Kuang Lee, R, Li, S H y col. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil. Steril.* 2008; 90:352-359.
29. Esbert, M Pacheco, A Vidal, F y col. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2011; 23:704-710.
30. Muriel, L Garrido, N Fernández, J L y col. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2006; 85:371-83.
31. Simon, L Murphy, K Shamsi, M B y col. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum. Reprod.* 2014; 11:2402-12.
32. Zhao, J Zhang, Q Wang, Y. y col. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014;102: 0015-0282.

33. Henkel, R, Hajimohammad, M Stalf, T y col. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 2004; 81:965-972.
34. Conrado Avendaño, M S Franchi, A Duran, H y col. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril.* 2010; 94:549-57.
35. Borini, A Tarozzi, N Bizzaro, D y col. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006; 21:2876-81.
36. Meseguer, M Stantiso, R Garrido, N. y col. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril.* 2011; 95: 124-8.
37. Uriondo, H, Álvarez Sedó, C Gil, M V y col. Niveles de correlación entre la externalización de fosfatidilserina y apoptosis espermática en pacientes con infertilidad masculina. *Reproducción* 2011; 26:111-116.
38. De Vos, A Van De Velde, H Joris, H. y col. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003; 79:42-8.
39. 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.
40. Ahmadi A Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2279-85.
41. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S y col. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PloS One.* 2009; 4: e7844.
42. Robinson, L Gallos, I D Conner, S J y col. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012; 27: 2908-17.
43. Muratori, M, Tamburrino, L, Tocci, V. y col. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 2010; 31:336-345.