

# Relación entre parámetros seminales y fragmentación del ADN espermático

Luciano Ganzer,<sup>1</sup> Natalio Kuperman,<sup>1</sup> Teresita Georgiatt,<sup>1,2</sup> Celina Palena,<sup>1</sup> Andrea Tissera,<sup>3</sup> Daniel Estofan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Integral de Ginecología Obstetricia y Reproducción (CIGOR). Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Centro de Estudio de la Mujer (CEDEM). Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR). Córdoba, Argentina.

Reproducción 2017;32:26-32

## Resumen

**Objetivo.** Evaluar la correlación entre fragmentación del ADN y parámetros seminales en pacientes que consultaron por infertilidad. **Diseño.** Estudio Observacional de casos en serie – Retrospectivo. **Materiales y Métodos.** Se incluyeron 1.562 pacientes. La fragmentación del ADN se realizó por técnica de TUNEL (valor de referencia normal < 20%). Los parámetros seminales se analizaron según OMS 2010. Estadística: Se utilizaron Chi-cuadrado y test de Spearman. **Resultados.** El 31,6% de los pacientes presentaron TUNEL aumentado. El TUNEL correlacionó inversa y significativamente con: concentración/ml, concentración total, movilidad total, movilidad progresiva rápida; morfología, vitalidad y madurez nuclear ( $p < 0,0001$ ). La proporción de hombres con TUNEL aumentado fue significativamente menor en presencia de parámetros seminales normales vs. disminuidos: concentración (29% vs. 47%); movilidad (25% vs. 50%), morfología (25% vs. 43%), y en pacientes normozoospermicos vs OAT (22,4% vs 54%);  $p < 0,0001$ . De los pacientes expuestos a agroquímicos, 45,3% presentaron TUNEL

aumentado (vs. 31% de pacientes no expuestos,  $p = 0,02$ ). **Conclusión.** Hay una correlación inversa y significativa entre TUNEL y parámetros seminales. La exposición a agroquímicos ambientales produciría fragmentación del ADN. Teniendo en cuenta la presencia de TUNEL aumentado en el 22% de pacientes normospermicos, podríamos inferir que la evaluación de la fragmentación de DNA espermático debe ser considerada como otra herramienta diagnóstica para el estudio de la pareja infértil.

**Palabras claves.** Espermograma, fragmentación de ADN, parámetros seminales, TUNEL, agroquímicos.

## Relationship between seminal parameters and sperm DNA fragmentation

### Summary

**Objective.** To evaluate the correlation between DNA fragmentation and seminal parameters in patients consulting for infertility. **Design.** Observational case study series – Retrospective. **Materials and Methods.** 1.562 patients were included. DNA fragmentation was measured with TUNEL assay (normal threshold value < 20%). Seminal pa-

**Correspondencia:** Luciano Ganzer  
Tel: 0351-156333478  
Fax: 0351-4694433  
Correo electrónico: lucianoganzer@gmail.com

rameters were analyzed according to WHO 2010. Statistic analysis: Chi-square and Spearman's tests were used. **Results.** 31,6% patients had abnormal TUNEL values. TUNEL values showed a negative correlation with concentration per ml, total concentration, total and rapid motility; morphology, vitality and nuclear maturity ( $p < 0,0001$ ). The proportion of men with abnormal TUNEL values was significantly different when comparing patients with normal vs. abnormal seminal parameters: concentration (29% vs. 47%); motility (25% vs. 50%), Morphology (25% vs. 43%), normospermic vs. OAT patients (22,4% vs. 54%);  $p < 0,0001$ . The 45,3% of patients exposed to agrochemicals showed increased TUNEL values vs. 31% of patients not exposed ( $p = 0,02$ ). **Conclusions.** There is an inverse and significant correlation between TUNEL and semen parameters. Exposure to environmental agrochemicals produce DNA fragmentation. Considering the presence of TUNEL increased in 22% of normospermic patients, we could infer that the evaluation of sperm DNA fragmentation should be considered as another diagnostic tool for the study of the infertile couple.

**Key words.** Semen analysis, DNA fragmentation, TUNEL assay, seminal parameters, pesticides.

## Introducción y objetivo

La esterilidad afecta a casi un 20% de las parejas en edad reproductiva. El fenómeno afecta a ambos sexos; el factor masculino parece estar involucrado en el 20-70% de los casos de infertilidad.<sup>1</sup>

La Organización Mundial de la Salud<sup>2</sup> ha establecido una serie de parámetros para evaluar el estudio del factor masculino, tales como el volumen del eyaculado, el pH, concentración espermática (número de espermatozoides/ml), movilidad y morfología de los espermatozoides, entre otros. Para cada parámetro analizado, se establecieron valores de referencia; sin embargo, se estima que

aproximadamente un 15% de los varones infértiles presentan un espermograma normal teniendo en cuenta estos valores.<sup>3</sup> Por lo tanto, estos parámetros básicos no serían del todo indicativos de la capacidad fértil de los espermatozoides presentes en una muestra seminal. Adicionalmente, se pueden estudiar otros tipos de parámetros, tales como la integridad del acrosoma, la evaluación de ciertas actividades enzimáticas o la integridad funcional de la membrana. La conclusión que se alcanza es que ningún parámetro, per se, puede considerarse de valor diagnóstico absoluto en la infertilidad masculina. La situación es todavía más crítica cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida. En la fertilización in vitro (FIV) o en la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI), la calidad de los espermatozoides que se utilizan requiere un control mucho más delicado que en el caso de la reproducción normal. Esto es debido, por una parte, a las manipulaciones técnicas que implican este tipo de procesos y, por otra, al simple hecho de que la necesidad de recurrir a esta clase de técnicas lleva implícito que puede existir algún problema que interfiere con la concepción normal.<sup>4</sup>

La presencia de defectos en el material genético, tales como las anomalías en la condensación de la cromatina, en relación con el proceso de la maduración del espermatozoide, la integridad de la molécula del ADN asociada con la presencia de roturas tanto de la cadena doble como de la cadena simple del ADN, o la presencia de anomalías cromosómicas, como pueden ser las aneuploidías o fallas en las reorganizaciones estructurales genómicas, se asocian estrechamente con la infertilidad.<sup>5</sup>

En lo que se refiere al origen del daño en el DNA del espermatozoide, nos enfrentamos a un efecto de naturaleza multifactorial en el que interviene una casuística no del todo delimitada. Se sabe que la generación de sustancias oxígeno reactivas (ROS)<sup>6</sup> o bien fallas en el intercambio de histonas por protaminas en la cromatina pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto. En relación directa con este tipo de acontecimientos, la presencia de apoptosis, como un suceso de muerte celular programada, tiene lugar también durante el proceso de maduración espermática.<sup>7,8</sup> No obstan-

te, es interesante destacar que la incidencia del fenómeno apoptótico en los espermatozoides de un eyaculado que se manipula para un procedimiento de reproducción asistida, generaría una serie de metabolitos que no serían eliminados por macrófagos, hecho que ocurriría en cualquier muerte celular a nivel somático in vivo. Esta situación puede generar un aumento de metabolitos reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma o bien nucleasas de remodelación de la cromatina, tales como la topoisomerasa. Todo este tipo de acción enzimática "fuera de control" puede contribuir e incluso acelerar el proceso de degradación celular, afectando de forma indirecta a otros espermatozoides.

Además, existen causas de naturaleza exógena que resultan en un incremento notable del daño que se observa en el ADN de un espermatozoide, tales como: el uso de ciertos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías anatómicas como el varicocele, la edad avanzada, contribuyen de forma notable al incremento en el daño del ADN espermático.<sup>9-12</sup>

En este contexto, se ha sugerido que el daño provocado en la molécula del ADN del espermatozoide, por razones de distinta naturaleza, puede afectar la salud del embrión, la del feto e incluso la de la descendencia.<sup>13,14</sup> Además, se ha propuesto que los efectos de este daño pueden asociarse a enfermedades que aparecen en la descendencia, tales como la propia infertilidad,<sup>15,16</sup> la presencia de cáncer en la niñez,<sup>9</sup> o bien relacionarse con ciertas enfermedades psiquiátricas y neurológicas como autismo y esquizofrenia.<sup>17</sup>

Estas situaciones hacen que cobre importancia el diagnóstico de la fragmentación del ADN en pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida.

El objetivo de este trabajo es evaluar la relación entre la fragmentación del ADN y los parámetros seminales estándares en un grupo de pacientes que consultaron por fertilidad. Además, se analiza el efecto de los hábitos tóxicos y de la exposición a agroquímicos en la integridad del ADN.

## Materiales y métodos

### Diseño. Estudio Observacional-Retrospectivo

Se analizaron 1.562 muestras de semen de pacientes que consultaron por infertilidad entre noviembre de 2008 y febrero de 2016.

Se evaluó la fragmentación del ADN por la Técnica de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit Roche). Se utilizó como valor de referencia normal un porcentaje de fragmentación < 20%.<sup>18</sup>

Se evaluaron además concentración, movilidad total y traslativos rápidos, morfología, vitalidad y madurez nuclear espermática, que se analizaron según normas OMS 2010.<sup>2</sup> Para el análisis de la concentración y movilidad espermática, se utilizó un autoanizador de semen (sistema CASA) Isas Lab de Proiser.

### Análisis de datos y estadística

Se analizó la correlación de los valores de TUNEL con los diferentes parámetros seminales mediante el coeficiente rho de Spearman.

Se consideraron los valores de normalidad de cada parámetro seminal (concentración  $\geq 15$  mill/ml, movilidad  $\geq 32\%$ , morfología  $\geq 4\%$ , madurez nuclear  $\geq 70\%$ , vitalidad  $\geq 58\%$ ), para dividir a los pacientes de acuerdo con la presencia normal o disminuida de cada parámetro por separado, y para dividirlos en normozoospermicos (concentración, movilidad y morfología normales) vs. oligoastenoteratozoospermicos (OAT). Se comparó entre estos grupos:

- la proporción de pacientes con TUNEL aumentado en cada grupo. Se usó Chi-cuadrado para la comparación de proporciones;
- el promedio de los valores de TUNEL de cada grupo. Se usó el test de Mann-Whitney para muestras independientes para la comparación de promedios y desvíos.

En cuanto a la exposición a tóxicos, se comparó la proporción de pacientes con TUNEL aumentado entre pacientes que refirieron diferente grado de consumo de alcohol y tabaco y entre pacientes que refirieron exposición o no a agroquímicos (se usó Chi-cuadrado y Chi-cuadrado para tendencia lineal para la comparación de proporciones).

Una  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa.

## Resultados

Del total de pacientes estudiados, el 32% (494/1.562) presentaba TUNEL aumentado, y el 68% (1.068/1.562) normal. En la Tabla 1 se describen los parámetros seminales de la población estudiada.

El valor de TUNEL tuvo una correlación inversa y significativa con los valores de concentración/ml y total, movilidad total y traslativos rápidos, morfología normal, vitalidad y madurez nuclear (Tabla 2).

En los pacientes con parámetros seminales normales o anormales, la proporción de pacientes con TUNEL aumentado fue significativamente mayor cuando los pacientes tuvieron concentración, movilidad, morfología espermática, vitalidad o madurez nuclear disminuida, en comparación con pacientes con estos parámetros normales ( $p < 0.0001$ , Tabla 3).

**Tabla 1.** Características de los parámetros seminales en la población estudiada.

|   | promedio $\pm$ sd | Rango      |
|---|-------------------|------------|
| Edad (años)                                       | 37,4 $\pm$ 5,6    | 19-71      |
| Abstinencia (días)                                | 3,8 $\pm$ 1,7     | 1-30       |
| Volumen seminal (ml)                              | 2,9 $\pm$ 1,4     | 0,2-9,8    |
| Concentración espermática (10 <sup>6</sup> /ml)   | 70,8 $\pm$ 60,9   | 0,15-423   |
| Concentración total (10 <sup>6</sup> / eyaculado) | 189,4 $\pm$ 176,3 | 0,62-1.442 |
| Movilidad total (%)                               | 44,1 $\pm$ 18,1   | 1-87       |
| Movilidad rápida (%)                              | 28,6 $\pm$ 15,3   | 1-73       |
| Morfología espermática (%)                        | 5,2 $\pm$ 3,3     | 0-20       |
| Vitalidad (%)                                     | 83,1 $\pm$ 8,9    | 23-97      |
| Madurez nuclear (%)                               | 74,1 $\pm$ 11,6   | 11-94      |
| TUNEL   | 17,0 $\pm$ 9,3    | 2-66       |

**Tabla 2.** Correlación entre los valores de TUNEL y de los diferentes parámetros seminales.

|   | rho   | IC 95%           | P       |
|---|-------|------------------|---------|
| Edad (años)                                       | 0,03  | -0,0264 a 0,0827 | 0,19    |
| Abstinencia (días)                                | 0,03  | -0,232 a 0,0769  | 0,29    |
| Volumen seminal (ml)                              | 0,01  | -0,426 a 0,0566  | 0,78    |
| Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)               | -0,21 | -0,255 a -0,160  | <0,0001 |
| Concentración total (10 <sup>6</sup> / eyaculado) | -0,17 | -0,220 a -0,124  | <0,0001 |
| Movilidad total (%)                               | -0,37 | -0,416 a -0,330  | <0,0001 |
| Movilidad rápida (%)                              | -0,36 | -0,402 a -0,316  | <0,0001 |
| Morfología espermática (%)                        | -0,29 | -0,338 a -0,243  | <0,0001 |
| Madurez nuclear (%)                               | -0,26 | -0,309 a -0,211  | <0,0001 |
| Vitalidad (%)                                     | -0,25 | -0,297 a -0,204  | <0,0001 |
| Concentración leucocitos /ml                      | 0,02  | -0,0298 a 0,0693 | 0,43    |

Al comparar los pacientes OAT y normozoospermicos, se encontró en los primeros una proporción significativamente mayor de pacientes con TUNEL aumentado: 54% vs. 22% respectivamente ( $p < 0,0001$ , Tabla 3).

Los valores promedio de TUNEL fueron significativamente mayores cuando los pacientes tuvieron concentración, movilidad, morfología o madurez nuclear disminuida, en comparación con pacientes con estos parámetros normales ( $p < 0,0001$ , Tabla 4).

Cuando se compararon pacientes OAT vs. normozoospermicos se encontró un valor promedio de TUNEL significativamente mayor en los primeros: (22,6  $\pm$  10,2 vs. 14,6  $\pm$  8,6 respectivamente ( $p < 0,0001$ , Tabla 4).

**Tabla 3.** Proporción de pacientes con TUNEL aumentado entre pacientes con parámetros seminales disminuidos o normales.

|  | Disminuida                 | Normal                       |
|--|----------------------------|------------------------------|
| Concentración<br>( $< 15$ vs. $\geq 15$ mill/ml)                         | 47% <sup>a</sup> (113/243) | 29% <sup>b</sup> (381/1.319) |
| Movilidad<br>( $< 32\%$ vs. $\geq 32\%$ )                                | 50% <sup>a</sup> (203/405) | 25% <sup>b</sup> (291/1.157) |
| Morfología<br>( $< 4\%$ vs. $\geq 4\%$ )                                 | 43% <sup>a</sup> (229/531) | 25% <sup>b</sup> (224/907)   |
| Madurez nuclear<br>( $< 70\%$ vs. $\geq 70\%$ )                          | 45% <sup>a</sup> (164/198) | 27% <sup>b</sup> (274/1.031) |
| Vitalidad<br>( $< 58\%$ vs. $\geq 58\%$ )                                | 60% <sup>c</sup> (18/30)   | 31% <sup>d</sup> (476/1.532) |
| Concentración<br>+ movilidad<br>+ morfología (OAT<br>vs. normospérmicos) | 54% <sup>a</sup> (58/108)  | 22% <sup>b</sup> (173/772)   |

Los valores son % de pacientes con TUNEL alterado / total de pacientes de cada grupo. a-b:  $p < 0,0001$ , c-d:  $p = 0,0015$ .

**Tabla 4.** Valor promedio de TUNEL entre pacientes con parámetros seminales disminuidos o normales.

|  | Disminuida                   | Normal                      |
|--|------------------------------|-----------------------------|
| Concentración<br>( $< 15$ vs. $\geq 15$ mill/ml)                     | 20,7 $\pm$ 9,7 <sup>a</sup>  | 16,4 $\pm$ 9,1 <sup>b</sup> |
| Movilidad<br>( $< 32\%$ vs. $\geq 32\%$ )                            | 20,15 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup> | 15,5 $\pm$ 8,8 <sup>b</sup> |
| Morfología<br>( $< 4\%$ vs. $\geq 4\%$ )                             | 20,0 $\pm$ 9,7 <sup>a</sup>  | 15,2 $\pm$ 8,7 <sup>b</sup> |
| Madurez nuclear<br>( $< 70\%$ vs. $\geq 70\%$ )                      | 20,5 $\pm$ 9,7 <sup>a</sup>  | 15,7 $\pm$ 8,9 <sup>b</sup> |
| Vitalidad<br>( $< 58\%$ vs. $\geq 58\%$ )                            | 23,1 $\pm$ 11,0 <sup>c</sup> | 16,9 $\pm$ 9,3 <sup>d</sup> |
| Concentración<br>+movilidad<br>+morfología OAT<br>vs normospérmicos) | 22,6 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup> | 14,6 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup> |

Los valores son promedio  $\pm$  sd. a-b:  $p < 0,0001$ , c-d:  $p = 0,0013$

## Asociación entre tóxicos y alteración del ADN espermático

Consumo de alcohol. Se comparó el porcentaje de pacientes con TUNEL aumentado entre los pacientes que refirieron no tomar alcohol ( $n = 835$ ), tomar más de un vaso por día ( $n = 582$ ) y más de dos vasos por día ( $n = 48$ ).

El porcentaje de pacientes con TUNEL aumentado fue de 30,6%, 31,3% y 35,4% respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,44$ ).

Consumo de tabaco. Se comparó el porcentaje de pacientes con TUNEL aumentado entre los pacientes que refirieron no fumar ( $n = 1116$ ), fumar más de una etiqueta por día ( $n = 307$ ) y fumar más de 2 etiquetas por día ( $n = 15$ ).

El porcentaje de pacientes con TUNEL aumentado fue 31,2%, 30,9% y 40% respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,84$ ).

Exposición conocida a agroquímicos. Del total de pacientes que refirió estar expuesto a agroquímicos ( $n = 64$ ), el 45,3% (29/64) presentó valores de TUNEL aumentado.

Al comparar este valor con el de los pacientes que refirió no estar expuesto a agroquímicos (31%, 465/1.498) la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,02$ ).

## Discusión

De acuerdo a nuestros resultados observamos una correlación negativa entre parámetros seminales y la fragmentación del ADN en cuanto a concentración por ml y por eyaculado total, movilidad total y traslativa rápida, vitalidad, morfología y madurez nuclear.

Otros autores encuentran correlación entre algunos parámetros seminales y fragmentación,<sup>19-23</sup> incluso con edad y abstinencia,<sup>19</sup> aunque los resultados son variados en cuanto a la asociación con la concentración.<sup>19-21</sup>

De todos modos, los autores coinciden en que las muestras de peor calidad son las que presentan un mayor daño en el ADN espermático.

Cohen-Bacrie<sup>19</sup> concluye que el daño del ADN sería un parámetro complementario que

no se encuentra fuertemente ligado a los demás parámetros seminales. Esto coincide con nuestros resultados, donde la correlación entre parámetros seminales y TUNEL es significativa, con valores que van de 0,17 a 0,37. La presencia de un 22% de pacientes con TUNEL alterado entre los normozoospermicos refuerza la necesidad de considerar el daño espermático como un parámetro seminal independiente.

En coincidencia con otros trabajos encontramos que la exposición a agroquímicos ambientales produciría un efecto deletéreo en la fragmentación del ADN.<sup>24-26</sup>

## Conclusión

De acuerdo a nuestros resultados se encontró una correlación inversa y significativa entre TUNEL y parámetros seminales. La exposición a agroquímicos ambientales produciría fragmentación del ADN. Teniendo en cuenta la presencia de TUNEL aumentado en el 22% de pacientes normospermicos, podríamos inferir que la evaluación de la fragmentación del DNA espermático debe ser considerada como otra herramienta diagnóstica para el estudio de la pareja infértil, y así poder tomar medidas terapéuticas que favorezcan el éxito reproductivo.

## Referencias

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A y col. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*;13:37. 2015
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. Geneva: WHO Press Health Organization, 2010.
3. Murray KS, James A, McGeady JB y col. The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. *Fertil Steril* 2012 98: 1428-1431.
4. Check JH, Graziano V, Cohen R y col. Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl* 2005; 51: 121-124.
5. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK y col. Susceptibility 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.
6. Zini A, Bielecki R, Phang D y col. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-677.
7. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC 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.
8. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J y col. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002; 23: 717-723.
9. Ji BT, Shu XO, Linet MS y col. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 238-244.
10. Weber RF, Dohle GR, Romijn JC. Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv Clin Chem* 2005; 40: 317-364.
11. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP y col. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005; 20: 2776-2783.
12. Enciso M, Muriel L, Fernández JL y col. 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: 106-111.
13. Brinkworth MH. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl* 2000 23: 123-135.
14. Perreault SD. Distinguishing between fertilization failure and early pregnancy loss when identifying male-mediated adverse pregnancy outcomes. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 189-198.
15. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122:497-506, 2001.
16. Silber SJ, Repping S. Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 217-29.
17. Cox GF, Bürger J, Lip V y col. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162-164.
18. Sergerie M, Laforest G, Bujan L y col. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20: 3446-3451.
19. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz YJ y col. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009; 91: 1801-1805.
20. Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E y col. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245-250.

21. 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.
22. Shen HM, Dai J, Chia SE y col. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 1266-1273.
23. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M y col. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 2009; 41: 383-386.
24. Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B y col. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61: 37-43.
25. Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 532-537.
26. Mehrpour O, Karrari P, Zamani N y col. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett* 230:146-56, 2014.