

## Fragmentación del ADN espermático: su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente

M Agustina González Torres,<sup>1</sup> Vanesa Rawe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> REPROTEC, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> CREA, Medicina de la Reproducción, Valencia, España.

Reproducción 2010;25:185-191

Como es de universal conocimiento, para el estudio de la infertilidad masculina se han establecido una serie de parámetros que se deben analizar de forma rutinaria en un laboratorio básico de andrología.<sup>1</sup> Estos son, el volumen del eyaculado, el pH, la concentración de espermatozoides, la motilidad y la morfología. Los parámetros seminales alterados y las roturas en el ADN nuclear están en estrecha asociación en humanos y su estudio ha merecido la atención en los últimos años. Se sabe, por ejemplo, que la fragmentación del material genético del espermatozoide es mayor en pacientes diagnosticados de oligoteratoastenozoospermia.<sup>2-5</sup> Gandini y col,<sup>6</sup> estudiando la relación entre apoptosis y parámetros seminales, también demostraron que un incremento de la fragmentación estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática y motilidad. Esta correlación se observó también con la morfología. Los gametos que mostraban roturas en su ADN presentaban cabezas pequeñas y amorfas.

Sin embargo, se estima que aproximadamente un 15% de los varones estériles presentan un espermograma normal.<sup>7</sup> Es decir, existe una población de hombres con problemas reproductivos que muestran características de concentración, movilidad y morfología normales. Cabe pensar entonces que muchas veces los parámetros seminales no son del todo indicativos de la calidad del espermatozoide. La situación es mucho más crítica cuando se utilizan técnicas de reproducción

asistida (FIV o ICSI), ya que la calidad del espermatozoide que se utiliza requiere un control mucho más delicado.

La transferencia de la molécula de ADN (íntegra e intacta) del espermatozoide al ovocito es crucial para conseguir una fecundación con ciertas perspectivas de éxito. Como postuló el Dr Juan Álvarez (La Coruña, España): *“Si nos preguntamos cuál es la función principal del espermatozoide, creo que todos estaríamos de acuerdo en que es la de introducir el ADN intacto dentro del ovocito. El ADN espermático es el manual de instrucciones del genoma paterno; una vez que se fusiona con el del ovocito dará lugar al genoma o manual de instrucciones del embrión, responsable de poner en marcha el desarrollo embrionario y fetal”*. Sin embargo, no existe una tecnología rápida para analizar la calidad del ADN de los espermatozoides que se pueda utilizar con la misma facilidad con que la que se procede para estudiar, por ejemplo, la motilidad. En este sentido, se sabe que la presencia de defectos en el material genético, tales como anomalías en la condensación de la cromatina, la integridad de la molécula de ADN asociada con la presencia de roturas tanto de doble como de simple cadena o la presencia de anomalías cromosómicas, se asocian estrechamente con la infertilidad.<sup>8</sup>

En cuanto al origen del daño en el ADN del espermatozoide, se sabe que tiene una naturaleza multifactorial. Por ejemplo, la generación de radicales libres de oxígeno (ROS)<sup>2,4</sup> en casos de leucocitospermia, tabaquismo, varicocele, edad avanzada y circunstancias ambientales como exposición a altas temperaturas o pesticidas, pueden

**Correspondencia:** Vanesa Rawe  
E-mail: vanesa.rawe@gmail.com

producir daño irreversible en el ADN del gameto.<sup>9-13</sup> Cabe agregar que la apoptosis (muerte celular programada) también culmina en la fragmentación del ADN y tiene lugar durante el proceso normal de maduración espermática testicular.<sup>14</sup> Se ha sugerido que el daño provocado en la molécula de ADN del espermatozoide por razones de distinta naturaleza, puede afectar la salud del embrión, la del feto e incluso la de la descendencia global.<sup>15,16</sup>

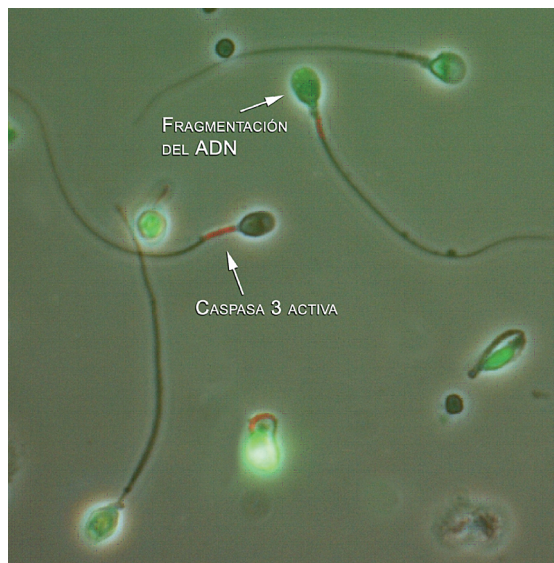
Existen diferentes estrategias para estudiar la fragmentación del ADN espermático. Por un lado, se encuentran las metodologías encaminadas a marcar las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble (totales), que se registran de forma natural o fortuita en la molécula de ADN; dentro de este grupo, podríamos incluir, por ejemplo, el ensayo de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*).<sup>17</sup> Por otro lado, una segunda estrategia de estudio de la fragmentación se basa en medir la distinta capacidad de la cromatina y en particular del ADN para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Aquí podríamos nombrar técnicas tales como el SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*),<sup>18</sup> el ensayo del Cometa bajo condiciones desnaturizantes y el SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*).<sup>19</sup>

El ensayo de TUNEL permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados a los extremos que quedan libres a causa de las roturas en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza *in situ* mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora deoxiuridina, modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. El nucleótido incorporado está directamente marcado con un fluorocromo. Teóricamente, la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN.<sup>17,20</sup> Esta técnica ha tenido muy buena aceptación dado que es versátil, está comercialmente disponible y los resultados pueden ser interpretados fácilmente.

En nuestras manos, la determinación se realiza con fluorescencia y la marca observada es muy clara a la hora de obtener un valor numérico (VN<20%). Acompañando a este ensayo incorporamos la marcación de **caspa** 3 activa. Las caspasas son los principales trasductores y efectores

de las señales de apoptosis que dan lugar a la muerte celular programada. Hasta la fecha se han identificado más de 14 tipos de caspasas que se han dividido en dos familias. Las caspasas -2,-3,-6,-7,-8,-9 y -10 median señales de apoptosis y las caspasas -1,-4,-5,-11 y -12 regulan citocinas durante procesos inflamatorios. Aunque la mayoría de ellas se sitúan en el citoplasma, algunos miembros pueden ser encontrados en asociación con las mitocondrias (-2,-3,-9) y en el aparato de Golgi (-12). La caspa 3 es la más importante de las efectoras ya que su activación marca un punto de *no retorno* en la señalización de la apoptosis. La presencia de caspa 3 activa en muestras de semen (Figura 1) puede ser medida por epifluorescencia y su presencia está relacionada con altos niveles de inmadurez espermática (especialmente en muestras de pacientes infértiles), disrupción del potencial de membrana mitocondrial (especialmente presente en las muestras descongeladas) y bajos niveles de penetración ovocitaria y descondensación del núcleo espermático.

**Figura 1.** Ensayos de TUNEL y caspa. Fragmentación del ADN espermático (verde, TUNEL) y caspa-3 activa (rojo) en espermatozoides obtenidos post-swim up y vistos al microscopio de epifluorescencia. Fuente: REPROTEC, Buenos Aires, Argentina.



En el estudio de SCSA o **Sperm Chromatin Structure Assay**, desarrollado por Evenson y col,<sup>18</sup> se desnaturaliza la molécula de ADN mediante una solución ácida o mediante un trata-

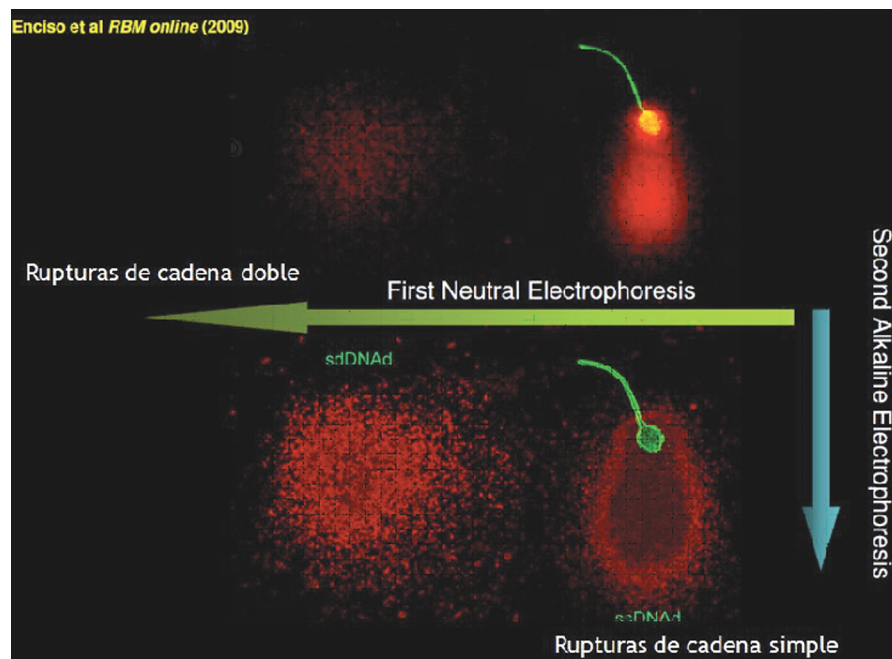
miento con calor, y una vez desnaturalizada se tiñe con naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero y al ser excitado emite una longitud de onda de 530nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (desnaturalizado) emite una longitud de onda de 640nm (color rojo). Las células se separan por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible de ser desnaturalizado y, por tanto, se visualizará en color rojo.<sup>21</sup>

El **ensayo de cometa** o electroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales.<sup>22,23</sup> Puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena del ADN. En esta técnica las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfidrilo de las protaminas y

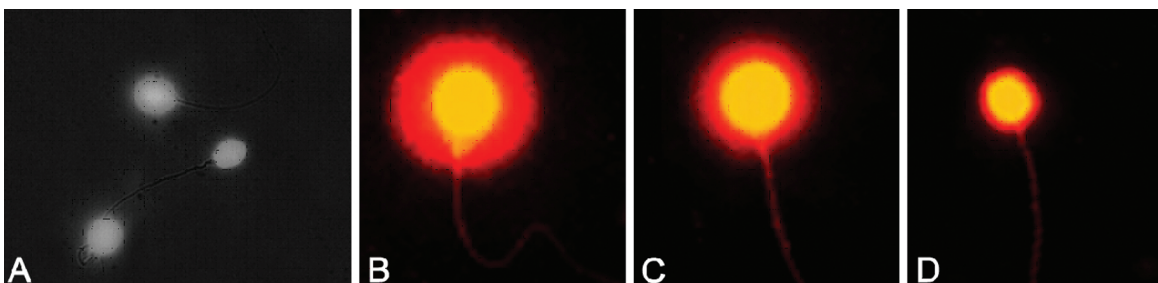
luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo. Luego el microgel es teñido con sustancias fluorescentes. Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo,<sup>22,23</sup> generando una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen (Figura 2). La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de poder detectar fragmentación de simple o doble cadena del ADN espermático ya que cada una de ellas tiene diferente impacto luego de la fecundación. Se sugiere que la fragmentación de doble cadena es aquella “no reparable” por el ovocito, mientras que la simple podría llegar a ser reparada por un ovocito sano y joven.

El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Este ADN se encuentra organizado en bucles que se compactan por acción de las protaminas intercaladas, las que estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. La técnica de SCD o

**Figura 2.** Fragmentación del ADN espermático estudiada por el ensayo de cometa de dos dimensiones. En una primera electroforesis neutral y horizontal se logran detectar fragmentación del ADN de doble cadena. En una segunda electroforesis alcalina se detectan rupturas de cadena simple. Los resultados de ambas rupturas son observados al microscopio de epifluorescencia a través de la coloración del ADN con Gel Red. Fuente: Enciso y col, RBM on-line (2009).



**Figura 3.** Ensayos de susceptibilidad cromatínica con fluorescencia. A) de manera panorámica y con contraste de fase se pueden observar diferentes tamaños de halos en la población espermática a estudiar. B) Halo grande, señal de cromatina intacta. C) Halo mediano. D) Halo chico, señal de cromatina dañada. Fuente: REPROTEC, Buenos Aires, Argentina.



*Sperm Chromatin Dispersion* consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina mediante la ruptura de los puentes disulfuro en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido seguido de una desproteización, donde los bucles de ADN se relajan constituyendo grandes halos alrededor de la estructura nuclear central. Por el contrario, los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan el halo de dispersión de la cromatina o éstos son de muy reducido tamaño.<sup>19</sup> Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión mediante microscopía tanto de campo claro como de fluorescencia es posible reconocer la presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos.<sup>24</sup> Los patrones a observar son los siguientes (Figura 3): las cabezas de espermatozoides donde se observan halos grandes o medianos no presentarían daño en el ADN espermático, mientras que aquellos con halos pequeños o sin ellos sugieren un daño en el ADN. Dentro de este grupo se encuentran también aquellos espermatozoides que presentan el núcleo degradado (Figura 3).

### Ensayos de fragmentación dinámica

La fragmentación *dinámica* del ADN espermático, es decir, la fragmentación del mismo durante determinadas horas de incubación, puede ser evaluada por SCD. La preparación de la muestra de semen para técnicas de reproducción asistida puede incrementar la tasa basal de daño en el

ADN especialmente en muestras “suceptibles”,<sup>25-27</sup> con una subsecuente reducción de la tasa de fertilidad.<sup>28</sup> Desafortunadamente, los mecanismos involucrados en la fragmentación del ADN en un eyaculado fresco o en una muestra procesada no son aún claros.<sup>29,30</sup> En varias especies de mamíferos se sabe que la tasa de fragmentación del ADN espermático se incrementa cuando las células están expuestas a variaciones de temperatura.<sup>27,31,32</sup> Por lo tanto, la tasa de fragmentación tiende a incrementarse luego de un periodo de incubación (usualmente horas) a 37°C y en una atmósfera con una baja concentración de CO<sub>2</sub>.<sup>33</sup> También se sabe que la centrifugación de muestras de semen con gran proporción de espermatozoides inmaduros (que producen altos niveles de ROS) puede resultar en un incremento del daño al resto de las células espermáticas.<sup>34,35</sup> Los procesos de congelación-descongelación no parecen afectar el nivel de fragmentación de ADN de los individuos fértiles. Sin embargo, esto puede no ser así con los espermatozoides de los individuos infértiles.<sup>36</sup>

Con lo anteriormente expuesto, podemos decir que una muestra puede aparentar ser normal (con bajos valores de fragmentación en un tiempo determinado) cuando es analizada inmediatamente después de ser obtenida, *pero que quizás no mantenga estos valores luego de ser procesada para técnicas de reproducción asistida*. Es sabido que transcurren varias horas entre la obtención de la muestra y su utilización. Por ejemplo, en FIV e ICSI, la inseminación/inyección de los ovocitos se realiza entre las 3 y 6 horas posteriores a la captación ovocitaria. Durante un FIV o ICSI deben trans-

currir entre 16-19 hs post-inseminación/inyección para observar y valorar si la fecundación de los ovocitos se ha producido correctamente. Con todo lo antedicho, ¿hasta qué punto un solo valor inicial de fragmentación del ADN espermático nos da una idea de la “performance” que ese espermatozoide tendrá al fecundar al ovocito? En otras palabras, ¿qué tipo de comportamiento tendrá una población de espermatozoides a 37°C?, ¿incrementará sus niveles de fragmentación de ADN de manera logarítmica afectando incluso a la fecundación o será de manera exponencial? Distintas dinámicas parecerían tener diferente impacto en los resultados de FIV-ICSI.

En los últimos años algunos autores creen necesario estudiar la *fragmentación del ADN espermático en el tiempo*. El análisis de la fragmentación dinámica 24 se realiza a 0 hs, 4 hs y 24 hs luego de que la muestra es procesada, pudiendo ser un punto a incluir las 8 hs post-eyaculado. Esta técnica nos brindará mayor información acerca de cómo proceder en el manejo de una muestra de semen que será utilizada en una técnica de reproducción asistida. Dada su sencillez se ha propuesto que la técnica de fragmentación dinámica puede ser potencialmente utilizada como prueba de rutina en el estudio de la fragmentación de ADN espermático en los laboratorios básicos de andrología.

### Significado Clínico

Es sabido que la calidad seminal, la capacidad de fertilización, la calidad del embrión y el desarrollo hasta blastocisto se ven influenciados por el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado presentes en la muestra.<sup>37</sup>

Como mencionamos anteriormente, la fragmentación del ADN espermático no parece tener una correlación plena con ninguno de los parámetros clásicos de calidad seminal que se analizan para estimar la capacidad fertilizante del individuo. **Las nuevas tendencias en la andrología moderna marcan “ir más allá de lo evidente” y completar el análisis del factor masculino con métodos que hablen de las características funcionales en las muestras espermáticas.**

En nuestra experiencia (resultados no publicados) entre un 10-15% de los pacientes con pará-

metros seminales normales tienen altos niveles de fragmentación del ADN espermático por lo que se aconseja su estudio con el fin de tener una visión más completa de la calidad seminal. El índice de fragmentación del ADN, evaluado mediante la técnica de SCSA, presenta una débil o moderada correlación con los criterios clásicos de calidad espermática.<sup>38,39</sup> Sin embargo, mediante la prueba de TUNEL y ensayo de cometa se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la motilidad, concentración y los parámetros morfológicos relacionados con formas normales.<sup>3</sup> El daño en el ADN evaluado mediante SCD muestra un incremento significativo en pacientes con OAT (47,1%±17,3) y en pacientes normozoospermicos (27,3%±11,7), frente a individuos fértiles (16,3%±6,0).<sup>24</sup> Sin embargo, el establecimiento de una correlación entre un alto grado de fragmentación en el ADN espermático y ausencia de embarazo, no se ha llegado a establecer de forma absoluta.<sup>40</sup> Obviamente, la capacidad que presenta el ovocito para reparar el ADN dañado también debe ser considerada. Cuando ocurre la fertilización con un espermatozoide que presenta daño en su ADN, la habilidad del ovocito para repararlo depende de la severidad de dicho daño.<sup>41</sup> Por lo tanto, el desarrollo embrionario puede fallar en cualquier etapa o llegar a término con ciertas anomalías. Se ha demostrado que la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado es significativamente más alta en varones de parejas con abortos recurrentes (38,0%±4,2) comparado con la de la población general (22,0%±2,0) o con la de donantes fértiles (11,9%±1,0).<sup>42</sup> A pesar de estos trabajos, los datos sobre la posible relación entre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y el desarrollo de abortos espontáneos, tanto aislados como de repetición, son escasos y por lo tanto no se pueden considerar que sean concluyentes.<sup>2,43,44,45</sup>

Podemos entonces afirmar que la evidencia en la literatura demuestra que el daño en el ADN en los espermatozoides afecta el resultado de la fertilidad de tal forma que una muestra de semen que presente una alta proporción de espermatozoides con ADN fragmentado tendría mayor dificultad para producir un embarazo que un semen con bajo nivel.

Cabe destacar que no existe un consenso claro sobre la técnica que se debe utilizar para medir el daño en el ADN de los espermatozoides de pacientes considerados como sub-fértiles, pero se propone a la técnica de TUNEL como de mayor proyección y fácil aplicación a la clínica rutinaria y la FRAGMENTACIÓN DINÁMICA como la próxima estrategia en el estudio del factor masculino funcional.

### Referencias

1. Spira A, Multigner L. Epidemiology of infertility in 1998 - Sperm density and environment. En: M Filicori, C Flamigni, Eds. Treatment of infertility: the new frontiers. Princeton Junction, New Jersey: Communication Media for Education, 1998.
2. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75(4):674-677.
3. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21(1):33-44.
4. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13(4):896-900.
5. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84(1):130-40.
6. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15(4):830-839.
7. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 1998;70(2):207-213.
8. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. 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(1):231-237.
9. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(3):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, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005;20(10):2776-2783.
12. Enciso M, Muriel L, Fernandez 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(1):106-111.
13. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002;23(5):717-723.
14. 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(10):2160-2165.
15. Brinkworth MH. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl* 2000;23(3):123-135.
16. 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.
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(3):528-532.
18. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210(4474):1131-1133.
19. Fernandez 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(1):59-66.
20. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27(1):53-59.
21. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Yimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996;66(4):634-639.
22. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339(1):37-59.
23. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1999;75(4):395-405.
24. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84(4):833-842.
25. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001;76(5):892-900.
26. Dalzell LH, Thompson-Cree ME, McClure N, Traub AI, Lewis SE. Effects of 24-hour incubation after freeze-thawing on DNA fragmentation of testicular sperm from infertile and fertile men. *Fertil Steril* 2003;79 (Suppl 3):S1670-S1672.

27. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 2007;68(9):1240-1250.
28. Wood S, Sephton V, Searle T, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, Kingsland C, Lewis-Jones I. Effect on clinical outcome of the interval between collection of epididymal and testicular spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *J Androl* 2003;24(1):67-72.
29. Jäättelä M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med* 2002;34(6):480-488.
30. Agarwal A, and Allamaneni SSR. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl* 2005;3:31-37.
31. Gosálvez J, Fernandez JL, Gosálbez A, Arroyo F, Agarwal A, and Lopez-Fernandez C. Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil Steril* 2007;88:S365.
32. Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosálvez J. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 2008;69(8):1022-1032.
33. Gosálvez J, Nuñez R, Caballero P, Fernandez J L, Cortes-Gutierrez E, and Lopez-Fernandez C. Fragmentación del ADN espermático, ¿un concepto estático o dinámico? *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2008;25:195-206.
34. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13(6):1864-1871.
35. 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(9):1912-1921.
36. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16(6):1191-1199.
37. Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004;56(3):235-245.
38. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepsen K, Frohm B, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003;80(6):1404-1412.
39. Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 2004;25(2):224-233.
40. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005;84:356-364.
41. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992;89(2):181-186.
42. 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(1):49-55.
43. Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML. Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl* 2005;51(2):121-124.
44. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81(5):1289-1295.
45. 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(6):1409-1417. Epub 2004 Apr 29.