



Los índices elevados de fragmentación del ADN espermático no se asocian con escasa blastulación o aumento de aneuploidía embrionaria en tratamientos de fertilización *in vitro*

Sperm DNA fragmentation indices are not correlated with poor blastulation or increased aneuploidy rates in patients undergoing IVF with PGT-A.

Omar Gutiérrez-Vela,¹ Carlos Hernández-Nieto,² Tamar Alkon-Meadows,² Martha Luna-Rojas,² Benjamin Sandler²

Resumen

OBJETIVO: Analizar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y el desarrollo embrionario; además, las tasas de euploidía embrionaria en una población diversa de parejas infértiles en quienes se practicaron tratamientos complejos de reproducción asistida con ICSI y análisis genético preimplantacional.

MATERIAL Y MÉTODO: Análisis de cohortes, retrospectivo, de pacientes atendidas de 2016 a 2020 con ICSI y al menos un embrión con biopsia para análisis genético preimplantacional en búsqueda de aneuploidía (PGT-a). Los grupos se dividieron en dos cohortes: índice de fragmentación del ADN (IFD) normal ($\leq 30\%$) y pacientes con índice de fragmentación aumentado (más de 30%). Parámetros de estudio: características demográficas de las poblaciones, parámetros clínicos embriológicos de laboratorio y tasa de euploidía entre ambas cohortes.

RESULTADOS: Se estudiaron 261 ciclos de FIV-ICSI con al menos un embrión biopsiado para búsqueda de aneuploidía. Grupo 1 (IFD $\leq 30\%$): 131 casos y Grupo 2 (IFD $> 30\%$): 130 casos. No se encontraron diferencias en las tasas de fertilización y blastulación entre los grupos de estudio. La tasa de euploidía embrionaria fue comparable entre los dos grupos: 46.2% ($n = 249$ de 538) vs 54.1% ($n = 302$ de 555), $p = 0.058$.

CONCLUSIONES: Nuestro estudio no mostró asociación entre el índice de fragmentación del ADN elevado y menores tasas de fertilización, blastulación embrionaria o euploidía.

PALABRAS CLAVE: Fragmentación de ADN espermático; desarrollo embrionario; ICSI; aneuploidía.

Abstract

OBJECTIVE: To analyze the relationship between the sperm DNA fragmentation index and embryonic development; in addition, the rates of embryonic euploidy in a diverse population of infertile couples in whom complex assisted reproduction treatments with ICSI and preimplantation genetic analysis were practiced.

MATERIAL AND METHOD: Retrospective cohort analysis of patients treated from 2016 to 2020 with ICSI and at least one embryo biopsied for preimplantation genetic analysis in search of aneuploidy (PGT-a). The groups were divided into two cohorts: normal DNA fragmentation index (DFI) ($\leq 30\%$) and patients with increased fragmentation index (more than 30%). Study parameters: demographic characteristics of the populations, clinical laboratory embryological parameters and euploidy rate between both cohorts.

¹ Programa Multicéntrico de Residencias Médicas, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey ITESM - Secretaría de Salud de Nuevo León SNNL, Monterrey, México.

² Reproductive Medicine Associates of New York - Icahn School of Medicine Mount Sinai Hospital, New York, USA.

Recibido: 24 de febrero 2020

Aceptado: 28 de agosto 2020

Correspondencia

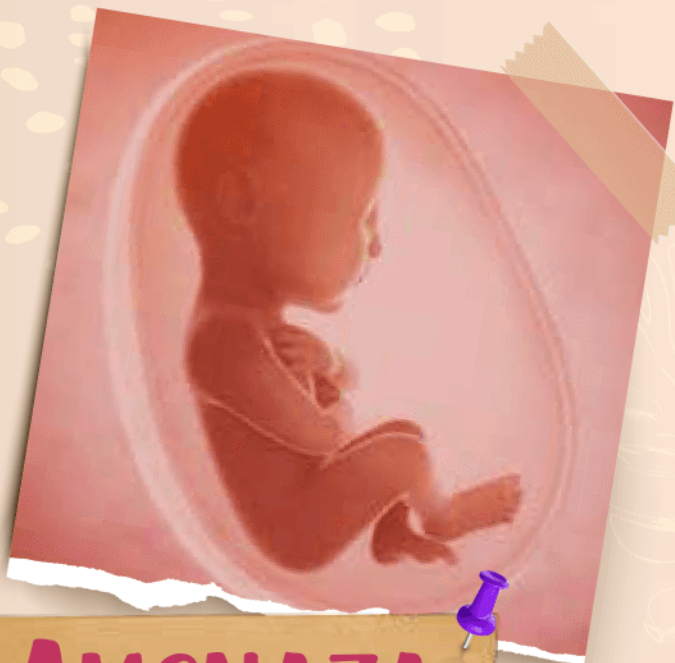
Omar Gutiérrez Vela
ogutierrez1@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Gutiérrez-Vela O, Hernández-Nieto C, Alkon-Meadows T, Luna-Rojas M, Sandler B. Los índices elevados de fragmentación del ADN espermático no se asocian con escasa blastulación o aumento de aneuploidía embrionaria en tratamientos de fertilización *in vitro*. Reproducción (México). 2020; Vol. 11: 10 de septiembre 1-9
<https://doi.org/10.24245/rmmr.v11id.3993>

Piperidolato

Como coadyuvante
en el tratamiento de:!



AMENAZA
de aborto



PARTO
PRETÉRMINO

Confíe en la **ACCIÓN ESPASMOLÍTICA** y
ÚTERORRELAJANTE de *Piperidolato*



¡YA DISPONIBLE!

En farmacias

Referencia: 1. Información para prescribir Dactil® OB
Material exclusivo para el Profesional de la Salud.
4M: MAT-MX-2001669

RESULTS: 261 cycles of IVF-ICSI were studied with at least one embryo biopsied for aneuploidy. Group 1 (DFI \leq 30%): 131 cases and Group 2 (DFI $>$ 30%): 130 cases. No differences were found in the rates of fertilization and blastulation between the study groups. The rate of embryonic euploidy was comparable between the two groups: 46.2% (n = 249 of 538) vs 54.1% (n = 302 of 555), p = 0.058.

CONCLUSIONS: Our study showed no association between high DNA fragmentation rate and lower rates of fertilization, embryonic blastulation or euploidy.

KEYWORDS: Sperm DNA fragmentation; Embryonic development; ICSI; Aneuploidy.

ANTECEDENTES

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los países industrializados el factor masculino (exclusivamente) en infertilidad representa 8% del total.^{1,2} Existen otros estudios que refieren que el factor masculino, por sí mismo, puede contribuir, incluso, con 40-50% a las tasas de infertilidad.³⁻⁷

Entre los componentes esenciales para la evaluación de la fertilidad masculina está el espermograma.⁸⁻¹⁰ Se dispone de otros exámenes o análisis seminales más especializados, pero no avalados por todas las sociedades médicas especializadas porque carecen de estandarización o evidencia suficiente que soporte su práctica rutinaria.¹¹⁻¹⁴ Entre ellos están: las pruebas de aglutinación,¹⁰ el estudio bioquímico del semen,¹⁵ los cultivos microbiológicos y otros estudios moleculares o bioquímicos, como la medición de radicales libres en el semen¹⁶ y el estudio funcional de medición de gangliósido GM1 (Cap-ScoreTM).¹⁷

Uno de los exámenes con mayor relevancia y repercusión en la actualidad es la medición de la fragmentación del ADN espermático.^{18,19} Existen distintas técnicas para efectuar esa medición.

El ensayo de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA)²⁰⁻²³ es una técnica que se fundamenta en la desnaturalización del ADN y tinción con naranja de acridina.²⁴ Otro tipo de pruebas, presumiblemente más sensibles y específicas, son el ensayo COMETA o electroforesis en gel de células individuales. Consiste en lisar las células mediante un agente reductor que permite que el ADN fragmentado pueda migrar en un proceso de electroforesis.^{24,25} El ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos del ADN que quedan libres, debido a sus rupturas. La señal es mayor cuanto mayor es el grado de fragmentación del ADN.^{24,26,27} Por último, la dispersión de la cromatina espermática (SCD)²⁸ consiste en producir una descondensación de la cromatina en los espermatozoides con ADN fragmentado.²⁴

Durante el proceso de espermatogénesis y fragmentación del ADN espermático las histonas son reemplazadas por las protaminas, que tienen como función empaquetar el genoma paterno dentro del núcleo espermático, además de ser necesarias para la condensación adecuada de la cromatina. Los defectos en la síntesis de las protaminas aumentan la vulnerabilidad de la



integridad nuclear espermática: fragmentan el ADN. Este último es un fenómeno multifactorial del que hasta ahora no se conoce del todo su fisiopatología.^{24,29}

Se ha propuesto que el ADN espermático alterado se correlaciona con escaso desarrollo embrionario,^{11,30} bajo potencial de implantación³¹ y menor tasa de fertilización^{32,33} e incremento de las tasas de pérdida gestacional recurrente,³⁴ anomalías meióticas espermáticas y aneuploidía embrionaria.^{11,34}

En la actualidad, la American Society for Reproductive Medicine (ASRM) no recomienda la medición de la fragmentación del ADN como una rutina de la práctica clínica porque no existe la suficiente evidencia para asociarla con desenlaces perinatales adversos luego de algún procedimiento de reproducción asistida.³⁵

El objetivo de este estudio consistió en: analizar la relación entre el índice de fragmentación del ADN espermático y el desarrollo embrionario; además, las tasas de euploidía embrionaria en una población diversa de parejas infértiles en quienes se practicaron tratamientos complejos de reproducción asistida con ICSI y análisis genético preimplantacional.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis de cohortes, retrospectivo, de pacientes atendidas entre 2016 y 2020, con ICSI y al menos un embrión con biopsia para análisis genético preimplantacional en búsqueda de aneuploidía (PGT-a). Se incluyeron todos los casos en los que se analizó el índice de fragmentación del ADN espermático. Éste se calculó con la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD). Los pacientes se dividieron en dos grupos, según el porcentaje calculado de fragmentación de ADN espermático: IFD normal (menos de 30%) y pacientes con IFD aumentado (más de 30%).³⁶

Se excluyeron los casos de pacientes en quienes se obtuvo el semen por extracción quirúrgica del testículo (TESE, TESA o biopsia testicular) o de muestras espermáticas criopreservadas; además, todos los casos de donantes de óvulos o espermatozoides. En todos los casos se aplicó ICSI como protocolo de inseminación. Se compararon las características demográficas de las poblaciones, parámetros clínicos embriológicos de laboratorio y la tasa de euploidía entre ambas cohortes. Todos los análisis genéticos previos a la implantación se practicaron mediante *Next Generation Sequencing* (NGS) en biopsias de trofoblasto. Las técnicas de estimulación ovárica controlada, cultivo extendido embrionario, biopsia de trofoblasto y análisis genético utilizados por nuestro grupo se han descrito previamente.³⁷

En cada grupo de edad de pacientes se calculó la tasa de aneuploidía embrionaria, lo mismo que por grupo de estudio según la cantidad de embriones aneuploides y la cantidad de biopsias de embrión por ciclo. La blastulación se definió como la coexistencia de blastocistos expandidos en día 5, 6 o 7 en cultivo. La clasificación morfológica embrionaria ya se describió.³⁷ Se calcularon intervalos de confianza de 95% de Clopper-Pearson, se compararon las variables categóricas mediante χ^2 ; las variables continuas se analizaron con las pruebas t de Student o Kruskal-Wallis y se consideraron significativamente estadísticos los valores de $p < 0.05$. Se efectuó un análisis de regresión logística multivariable que incluyó un modelo lineal con ecuaciones de estimación generalizadas (GEE) para ajustar los potenciales confusores. La razón de momios se calculó con IC95% para alcanzar 80% de poder en la detección de una diferencia en las tasas de euploidía de al menos 20% con un error alfa de 0.05. Se calculó un tamaño de muestra por grupo de 93 embriones analizados. Para el análisis estadístico se utilizó SAS-STAT versión 9.4 (2017, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Se estudiaron 1093 embriones a los que se tomó biopsia, obtenidos de 261 casos de ICSI con, al menos, la biopsia de un embrión para búsqueda de aneuploidía. Grupo 1 (IFD $\leq 30\%$): 131 casos ($n = 538$ embriones) y grupo 2 (IFD $> 30\%$): 130 casos ($n = 555$ embriones). La información descriptiva y demográfica de ambos grupos se muestra en el **Cuadro 1**. En el análisis comparativo se encontraron diferencias significativas en la edad de los pacientes (37.8 ± 5.2 vs 39.7 ± 6.2 ; $p = 0.006$) y las pacientes (34.8 ± 4.9 vs 36.1 ± 4.3 , $p = 0.01$) y los casos con análisis espermático morfológico normal (52 vs 36%, $p = 0.007$) entre cohortes. No se encontraron

diferencias significativas en las tasas de fertilización, blastulación y cigotos que alcanzaron la etapa de clivaje entre los grupos de estudio (**Cuadro 2**). La tasa de euploidía embrionaria fue comparable entre las dos poblaciones (46.2% [$n = 249$ de 538] vs 54.4% [$n = 302$ de 555]; $p = 0.058$). Se practicó un subanálisis de las tasas de euploidía embrionaria por grupos de edad reproductiva de la *Society for Assisted Reproductive Technology* (SART) en la que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (**Figura 1**). En un análisis multivariable, ajustando para edad de los y las pacientes: IMC, concentraciones de hormona antimülleriana, análisis de semen normal y cantidad de embriones biopsiados, no se encontró

Cuadro 1. Análisis comparativo entre variables demográficas, parámetros clínicos y de laboratorio de embriología entre grupos

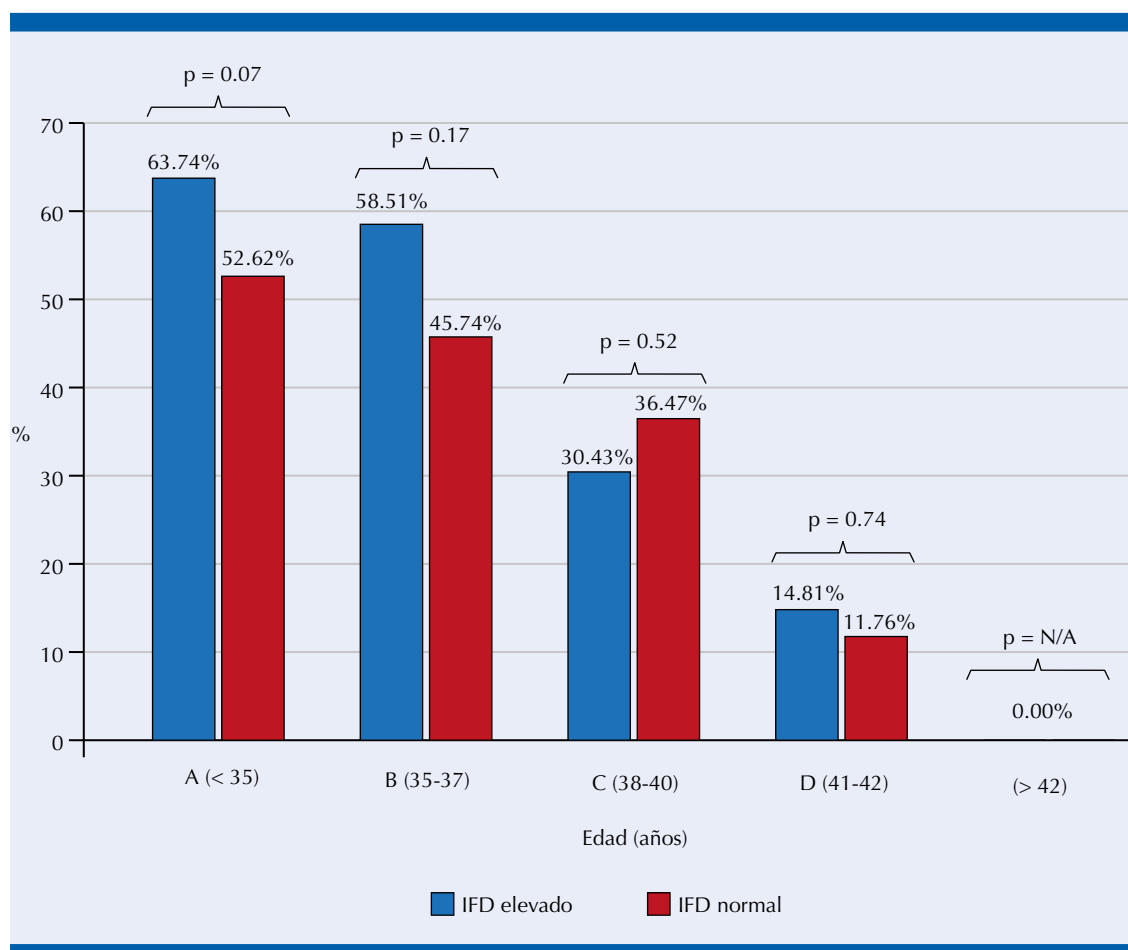
	IFD normal ($< 30\%$) $n = 131$		IFD anormal ($\geq 30\%$) $n = 130$		Valor p
	Media	DE	Media	DE	
IFD%	13.4	6.14	35.2	14.22	< 0.0001
Edad del padre	37.82	5.22	39.77	6.22	0.006
Edad de la madre	34.81	4.9	36.17	4.33	0.01
Índice de masa corporal	22.49	3.75	23.25	3.41	0.09
Aspiraciones previas de ovocitos	1.07	1.51	0.85	1.06	0.18
Estradiol al momento del disparo	2559.31	1185.74	2367.85	1126	0.19
Valor de FSH	5.36	2.99	5.63	3.3	0.56
Hormona antimülleriana	2.95	2.02	3.35	3.01	0.26
Cuenta de folículos antrales	12.86	5.86	13.35	6.31	0.57
Ovocitos aspirados	16.95	8.42	15.71	8.98	0.25
Ovocitos inyectados en metafase II	12.71	6.74	12.33	7.23	0.66
Ovocitos fertilizados	9.79	5.65	9.16	5.76	0.37
Embriones en etapa de clivaje	9.34	5.4	8.78	5.46	0.4
Cuenta de blastocistos	6.68	4.61	6.22	3.97	0.38
Blastocistos biopsiados	4.24	3.17	4.4	3.29	0.67
Media de embriones euploides	1.96	2.02	2.4	2.51	0.12
	Núm.	%	Núm.	%	
Casos de análisis normal de semen	69/131	52.67	47/130	36.15	0.007

IFD: índice de fragmentación del ADN; DE: desviación estándar.

**Cuadro 2.** Análisis comparativo entre tasas de fertilización, blastulación y euploidía embrionaria entre grupos

	IFD normal (< 30%) N = 131		IFD anormal (> 30%) N = 130		Valor p
Tasa de fertilización (%)	1282/1667	76.9	1191/1585	75.14	0.56
Tasa de blastulación (%)	875/1282	68.25	808/1191	67.84	0.9
Embriones biopsiados (%)	538/875	61.49	555/808	68.69	0.06
Embriones euploides (%)	249/538	46.28	302/555	54.41	0.058
Embriones aneuploides (%)	258/538	47.96	225/555	40.54	0.06
Resultado indeterminado (%)	31/538	5.76	28/555	5.05	0.61

IFD: índice de fragmentación del ADN.

**Figura 1.** Tasas de ploidía divididas por grupos de edad materna.

IFD: índice de fragmentación del ADN.

asociación entre el índice de fragmentación elevado y la disminución en las posibilidades de euploidía embrionaria (OR = 1.10, IC95%: 0.7-1.6; $p = 0.63$).

DISCUSIÓN

A partir de la validación del espermograma como método diagnóstico y pronóstico para factor masculino, hasta la fecha, ningún otro tipo de estudio ha logrado ser de utilidad indispensable para el estudio de las parejas infértiles.³⁸ De ahí surgió la necesidad de estudios de validación experimental y clínica acerca de la verdadera utilidad de la medición de la fragmentación del ADN espermático, entre otros. Nuestro estudio sugiere que no existe una relación significativa entre el índice de fragmentación elevado y las alteraciones en las tasas de euploidía o blastulación en pacientes con ICSI. Estos hallazgos son comparables con los de estudios previos en los que se demostró que no existe una relación significativa entre las tasas de euploidía y el índice de fragmentación del ADN espermático.^{11,39} El análisis cromosómico practicado en esos estudios se hizo con microrreordenaciones de hibridación genética comparativa (array-CGH o aCGH) y FISH (hibridación fluorescente *in situ*). FISH y aCGH son técnicas en desventaja si se comparan con el análisis de secuenciación de nueva generación o NGS.⁴⁰ Aún mas, en nuestro estudio, al llevar a cabo un subanálisis para comparar grupos de edad de la *Society for Assisted Reproductive Technology* y las respectivas tasas de euploidía embrionaria en pacientes con índice de fragmentación elevado *versus* índice de fragmentación normal, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos comparados (**Figura 1**). Al efectuar el subanálisis y dividir una población en múltiples subgrupos pudo limitarse la validez externa de los hallazgos debido a que se afectó la cantidad de muestra, sobre todo en grupos de edad mayor en los que es más complejo obtener una cantidad suficiente

de embriones euploides para alcanzar poder estadístico suficiente para detectar diferencias pequeñas.

Además de las tasas de euploidía, en nuestro estudio no se observó una diferencia significativa en las tasas de blastulación entre los grupos comparados. Estos desenlaces coinciden con los obtenidos por Bounartzi y su grupo⁴¹ quienes encontraron una relación significativa entre los índices de fragmentación elevados y el desarrollo embrionario. En contraste con nuestros hallazgos se publicaron dos estudios en donde sí se observó correlación negativa entre el índice de fragmentación y las tasas de blastulación,^{30,42} aunque en esos estudios el tamaño de la muestra fue muy bajo en comparación con nuestro estudio, además de que analizaron una cantidad de muestra limitada para detectar diferencias en la calidad embrionaria y no se especifica en la metodología cuál fue la estrategia de selección embrionaria utilizada.⁴³

Otras variables observadas en nuestro estudio fueron: la edad media de los pacientes y su relación con el índice de fragmentación espermática. En el grupo de pacientes con índice de fragmentación elevado se observó un promedio de edad mayor *versus* el grupo control. Además, se observó asociación entre pacientes con espermograma anormal e índice de fragmentación elevado. Estos hallazgos son similares a los que se demostraron en el metanálisis de Johnson y su grupo.⁴⁴

Otra más de las variables analizadas fue la tasa de fertilización, que en el grupo de pacientes con índice de fragmentación normal fue de 76.9%, que fue estadísticamente comparable con la del índice de fragmentación elevado de 75.1% ($p = 0.56$). Lo que encontramos es compatible con lo publicado por Borges y colaboradores⁴² en donde sus desenlaces fueron de una tasa de fertilización similar entre sus dos grupos comparados.



Entre las fortalezas del estudio está el tamaño de las cohortes más grande analizado a la fecha en un mismo centro. La cantidad de embriones analizados cumple con el cálculo de muestra especificado previamente para detectar diferencias significativas. Otro punto a destacar es el análisis multivariable, ajustado para los potenciales confusores, en el que no se encontró asociación entre el índice de fragmentación del ADN elevado y las tasas anormales de ploidía. También cuenta que para el análisis genético previo a la implantación solo se utilizó secuenciación de nueva generación (NGS), que es uno de los análisis para composición cromosómica embrionaria más sensibles y validados a la fecha.⁴⁵ Este factor elimina los potenciales riesgos de desenlaces falsos negativos o positivos que se registran con otras plataformas: aCGH o FISH. Otra fortaleza más es el haber recurrido a un método de medición para el índice de fragmentación del ADN (SCD) que genera homogeneidad en el análisis de los resultados. Hasta ahora no se dispone de una plataforma validada o aceptada como patrón de referencia para la medición de la fragmentación del ADN espermático. En el análisis publicado por Ribas-Maynou y su grupo se compararon los distintos métodos de medición de índices de fragmentación del ADN espermático y concluyeron que cualquiera de las cuatro plataformas de medición utilizadas en nuestro estudio son relativamente comparables entre sí.⁴⁶

Entre las limitaciones de este estudio están: el diseño retrospectivo que por sí mismo implica un sesgo en la selección de los grupos de pacientes y no permite establecer la verdadera relación causa-efecto. Además, la heterogeneidad de diagnósticos de infertilidad femenina o masculina, aunque se excluyeron los casos de factor masculino severo o las muestras de semen criopreservadas, factores que se ha demostrado pueden afectar las tasas de blastulación embrionaria y de fragmentación del ADN espermático.⁴⁷ En este estudio solo se analizaron la asociación

entre los índices elevados de fragmentación del ADN espermático y las tasas de ploidía y blastulación embrionaria y no se consideraron otras variables: tasas de implantación, embarazo clínico, pérdida gestacional y otros desenlaces perinatales, porque no estuvieron comprendidos en los objetivos.

Es necesario llevar a cabo estudios prospectivos con asignación al azar, con una muestra representativa de pacientes, con una plataforma única y validada de medición del índice de fragmentación del ADN, que incluya los desenlaces reproductivos y el seguimiento a largo plazo de los embarazos logrados. Así, podrá evaluarse adecuadamente la verdadera repercusión de la fragmentación del ADN espermático en las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida, y su potencial influencia, a largo plazo, en los desenlaces perinatales.

CONCLUSIÓN

No se encontró asociación entre la elevación del índice de fragmentación del ADN y las tasas de fertilización, blastulación o tasas de ploidía embrionaria en tratamientos de ICSI con PGT-a. Este estudio aporta a la evidencia científica que demuestra que no existe asociación significativa entre el índice de fragmentación del ADN elevado con las alteraciones en el desarrollo y la estructura cromosómica embrionaria en tratamientos de reproducción asistida. Esta conclusión desafía la utilidad clínica de este tipo de análisis espermáticos durante la toma de decisiones y tratamientos clínicos en pacientes infértiles a quienes se practican tratamientos de reproducción asistida.

REFERENCIAS

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008; 90: S60. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.002

2. WHO Technical Report Series. Recent Advances in Medically Assisted Conception 1992; 820: 1-111.
3. Henkel R, et al. Sperm function and assisted reproduction technology. *Reprod Med Biol* 2005; 4: 7-30. <https://doi.org/10.1007/BF03016134>
4. Jungwirth A, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 up- date. *Eur Urol* 2012; 62: 324.
5. Punab M, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod* 2017; 32: 18-31.
6. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103: e18-25.
7. Jungwirth A, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62: 324.
8. McLachlan RI, et al. Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology* 2003; 35: 25.
9. Cooper TG, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 231.
10. World Health Organization Department of Reproductive Health and Research. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed, World Health Organization, Geneva, Switzerland 2010.
11. Gat I, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. *PLoS One*. 2017 Jun 7;12(6): e0179002. doi: 10.1371/journal.pone.0179002. eCollection 2017.
12. Bach PV, et al. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic Clin Androl* 2016 Dec 5; 26: 15. eCollection 2016. Review.
13. Cissen M, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11): e0165125. doi: 10.1371/journal.pone.0165125
14. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril*. 2014;102 (6): 1502. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.021
15. Dieudonné O, et al. Biochemical analysis of the sperm and infertility. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:455.
16. Agarwal A, Bui AD. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. *Investig Clin Urol*. 2017 Nov;58(6):385-399.
17. Cardona C, et al Localization patterns of the ganglioside GM1 in human sperm are indicative of male fertility and independent of traditional semen measures. *Mol Reprod Dev*. 2017 May;84(5):423-435
18. Rex AS, et al. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017; 5 (4): 622-630. doi: 10.1111/andr.12381
19. Pollister AW & Mirsky AE. The nucleoprotamine of trout sperm. *J Gen Physiol* 1946; 30: 101-16.
20. Evenson DP, et al. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-1133.
21. Evenson DP, et al. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
22. Larson KL, et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717-22.
23. Larson-Cook KL, et al. 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.
24. Quintero-Vásquez GA, et al. Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2):144-151, 2015 DOI: 10.1016/j.recqb.2015.09.006
25. Hughes CM, et al. 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: 613-19.
26. Gorczyca W, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-5.
27. Henkel R, et al. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 2010; 42: 305-13.
28. Fernandez JL, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.
29. Gonzalez-Marín C, et al. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 14026-52.
30. Alvarez Sedó C, et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assist Reprod*. 2017; 21 (4): 343-50. doi: 10.5935/1518-0557.20170061
31. Coughlan C, et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl*. 2015; 17 (4): 681-5. doi: 10.4103/1008-682X.144946
32. Simon L, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017; 19 (1): 80-90. doi: 10.4103/1008-682X.182822
33. Zhang Z, et al. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *J*



- Assist Reprod Genet. 2015; 32 (1): 17-26. doi: 10.1007/s10815-014-0374-1
34. Zidi-Jrah I, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2016; 105 (1): 58-64. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.041
35. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril* 2013; 99: 673-7.
36. Virro MR, et al. 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): 1289-9.
37. Hernandez-Nieto C, et al. What is the reproductive potential of day 7 euploid embryos? *Hum Reprod*. 2019 Aug 9. pii: dez129. doi: 10.1093/humrep/dez129
38. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. First ed. Singapore: Press Concern; 1980.
39. Bronet F, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod*. 2012; 27 (7): 1922-9. doi: 10.1093/humrep/des148. Epub 2012 Apr 26.
40. Brezina PR, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33 (7): 823-32.
41. Bounartzi T, et al. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients, *Human Fertility* 2016. doi: 10.3109/14647273.2016.1157629
42. Borges E Jr, et al. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertil Steril*. 2019 Jun 11. pii: S0015-0282(19)30408-X. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.04.029
43. Rienzi L, et al. Sperm DNA fragmentation to predict embryo development, implantation and miscarriage: still an open question. *Fertility and Sterility* 2019. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.05.016
44. Johnson SL, et al. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015; 19: 22-33. doi: 10.1016/j.arr.2014.10.007
45. Sermon K. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17 (1): 71-82.
46. Ribas-Maynou J, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013; 1 (5): 715-22. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x
47. Mazzilli R, et al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. *Fertil Steril*. 2017; 108 (6): 961-72.