

A Importância da Integridade da Cromatina dos Espermatozóides na Infertilidade Masculina

The Significance of Sperm Chromatin Integrity in Male Infertility

.....

Autores:

Ana Paula Sousa^{1,2}, João Ramalho Santos¹, Teresa Almeida Santos²

.....

Instituição:

¹Centro de Neurociências e Biologia Celular, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra,
Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal

²Serviço de Reprodução Humana, Hospitais da Universidade de Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal

.....

Correspondência:

Ana Paula Sousa - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Departamento de Ciências da Vida,
Universidade de Coimbra, Apartado 3046, 3001-401 Coimbra, Portugal.

E-mail: apmsousa@ci.uc.pt

.....

RESUMO

Apesar da elevada compactação do núcleo dos espermatozóides, estes podem apresentar danos na cromatina, pondo em causa a correcta transmissão da informação genética paterna. Estes danos podem ser a consequência de processos de apoptose ou stresse oxidativo ou o resultado de falhas no empacotamento do ADN durante a espermatogénese, que podem ser despoletados por uma série de condições tais como a idade ou a exposição a contaminantes ambientais. A evidência disponível até à data indica que a integridade da cromatina dos espermatozóides será um parâmetro importante para a função dos gâmetas masculinos, reflectido quer na correlação com os parâmetros seminais, quer nas taxas de gravidez. Existem diversos métodos para avaliar a integridade da cromatina nos espermatozóides. No entanto, este parâmetro não tem sido avaliado de forma rotineira nos laboratórios de andrologia provavelmente devido à dificuldade de implementação das técnicas existentes. Com o aparecimento de uma técnica simples para avaliar a integridade da cromatina, o teste baseado na coloração tipo Diff-Quik, esta avaliação rotineira passa a ser possível. Por

outro lado, o uso de antioxidantes parece ser uma solução promissora para diminuir o nível de danos na cromatina dos espermatozóides e, conseqüentemente, os seus efeitos nefastos na fertilidade.

Palavras-chave: Funcionalidade do Espermatozóide, Integridade da Cromatina, Infertilidade Masculina

ABSTRACT

Even if sperm chromatin is highly packed, the chromatin can suffer damages, which could impair the correct transmission of the paternal genetic information. These damages can result from apoptosis, oxidative stress or errors in DNA packaging during spermatogenesis, triggered by several conditions such as aging or the exposure to environmental pollutants. Evidence suggests the sperm chromatin integrity as an important parameter of the male gamete function, mirrored by the correlation with the seminal parameters as well as by pregnancy rates. Several methods have been used to monitor sperm chromatin integrity. However, this parameter is not routinely evaluated in andrology laboratories probably due to the complexity in the routine introduction of novel methodologies. With the development of a simple technique to monitor chromatin integrity, based on the use of Diff-Quik like stains, this parameter can be routinely monitored. Additionally, the use of antioxidants seems to be a promising answer to decrease sperm chromatin damages and, consequently, reduce its negative impact on fertility.

Key-words: Sperm Function, Chromatin Integrity, Male Infertility

A Importância da Integridade da Cromatina dos Espermatozóides na Fecundação

Durante o processo de fecundação o espermatozóide contribui com a informação genética paterna ao embrião. Essa informação, contida no núcleo dos espermatozóides está organizada de forma única. Em comparação com o que acontece nas células somáticas, a cromatina dos espermatozóides encontra-se num estado mais condensado e compacto¹, característica que se deve à troca das proteínas nucleares presentes nas células somáticas (histonas) por protaminas, específicas dos espermatozóides, durante a espermatogénese^{2,3}.

Apesar do estado de compactação da cromatina, que lhe confere uma protecção contra eventuais danos⁴, os espermatozóides ejaculados apresentam por vezes danos na cromatina, o que pode pôr em causa a correcta transmissão da informação genética paterna. Numa população

de indivíduos com problemas de fertilidade, são encontrados espermatozóides com danos na cromatina em mais de 40% dos indivíduos⁵.

Mecanismos que Interferem com a Integridade da Cromatina em Espermatozóides

Os danos da cromatina dos espermatozóides podem apresentar-se quer sob a forma de quebras no ADN (ácido desoxirribonucleico) quer sob a forma de deficiências ao nível da compactação da cromatina e, apesar de não se conhecerem todos os mecanismos, são várias as circunstâncias que podem levar a danos na cromatina.

A) Apoptose

Muitos estudos indicam que a presença de danos na cromatina dos espermatozóides, e mais especificamente de quebras/fragmentação do ADN, resultam de um processo de apoptose. De facto, numa fase final da apoptose ocorre

a activação de endonucleases endógenas que clivam o ADN⁶ e a fragmentação do ADN é frequentemente considerada como um marcador de apoptose, nomeadamente em relação aos espermatozóides^{7,8,9}. Tem sido sugerido que um aumento nos níveis de apoptose leve à ocorrência de danos no ADN dos espermatozóides¹⁰. No entanto, e apesar de diversos marcadores da apoptose, tais como a Anexina-V, estarem presentes em espermatozóides, não tem sido encontrada uma correlação entre a presença de danos na cromatina e a presença de marcadores da apoptose^{11,12}.

B) Stresse Oxidativo

Para além da apoptose, tem sido sugerido que os danos na cromatina resultem directamente do stresse oxidativo⁸. Estudos indicam uma correlação significativa entre o stresse oxidativo e a presença de danos no ADN de espermatozóides¹³. A ocorrência de stresse oxidativo poderá ser devida à produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS), quer por células espermáticas imaturas, quer por leucócitos ou macrófagos, durante um processo inflamatório^{14,15}. O plasma seminal possui defesas antioxidantes mas quando a produção de ROS excede a actividade das defesas antioxidantes enzimáticas ocorre stresse oxidativo^{15,16,17}.

C) Falha no Empacotamento do ADN

A integridade da cromatina poderá ser o resultado de erros que ocorrem na espermatogénese durante o empacotamento do ADN, nomeadamente na troca de histonas por protaminas⁸. Os erros que ocorrem durante a espermatogénese poderão decorrer de deficiências na reparação das quebras no ADN que se originam para que haja a troca de histonas por protaminas¹⁸. Outro dos mecanismos descritos é a ocorrência de uma anomalia genética, mais comum em indivíduos inférteis, que se caracteriza por um défice em protaminas, levando a que o ADN esteja mais vulnerável¹⁹.

Factores Desencadeantes dos Mecanismos que Interferem com a Integridade da Cromatina em Espermatozóides

Muitas são as causas que podem levar a que ocorra apoptose, elevada produção de ROS, falhas no empacotamento ou mais do que um destes mecanismos simultaneamente. Uma dessas causas é o tabagismo. Estudos indicam que indivíduos não fumadores apresentam níveis mais baixos de espermatozóides com fragmentação do ADN do que indivíduos fumadores⁵. Por outro lado, tem sido demonstrado que a exposição a poluentes ambientais tem um impacto negativo na integridade da cromatina dos espermatozóides. De facto, populações de indivíduos expostos a contaminantes apresentam níveis mais elevados de danos na cromatina^{20,21,22}. Também tem sido observado que, com o aumento da idade do indivíduo, existe uma diminuição da integridade da cromatina^{23,24}. De igual modo, estudos recentes demonstraram que existe um aumento dos níveis de espermatozóides com danos na cromatina em indivíduos com varicocele²⁵ ou que tenham sofrido de criptorquidismo^{24,26,27}, podendo este último dever-se a um aumento da temperatura testicular, condição que também leva a um aumento dos danos na cromatina dos espermatozóides²⁸. Por último, tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia também poderão afectar a integridade da cromatina dos espermatozóides²⁹.

A Importância da Integridade da Cromatina/ADN na Funcionalidade dos Espermatozóides

Para além da importância na fecundação, diversos estudos mostraram que existe uma correlação negativa entre a presença de danos no ADN dos espermatozóides e os parâmetros seminais clássicos. De facto, existe uma correlação entre a integridade da cromatina e a concentração, a mobilidade e a morfologia dos espermatozóides^{5,7,12,24,30}. Adicionalmente,

indivíduos normozoospermicos, com todos os parâmetros seminais clássicos dentro dos valores normais, têm níveis de fragmentação de ADN significativamente mais baixos do que indivíduos com um ou mais parâmetros seminais alterados⁴². De igual modo, indivíduos inférteis apresentam um aumento dos danos na cromatina dos espermatozóides quando comparados com indivíduos férteis³¹.

O estado da cromatina dos espermatozóides, parâmetro que não é monitorizado aquando da avaliação rotineira da qualidade seminal, tem sido apontado como um indicador de infertilidade masculina³². Diversos autores defendem que a integridade da cromatina deveria ser rotineiramente avaliada juntamente com os parâmetros seminais clássicos²⁴. De facto, foi demonstrado recentemente que, nalgumas situações, a integridade da cromatina tem maior poder preditivo da possibilidade de concepção natural do que os parâmetros seminais isoladamente³³.

A Importância da Integridade da Cromatina dos Espermatozóides na Fertilidade

Embora seja controverso que a avaliação da integridade da cromatina dos espermatozóides tenha relevância na predição de uma gravidez após a realização de técnicas de reprodução assistida³⁴, muitos são os estudos que demonstram que existe uma correlação entre a presença de danos na cromatina e os resultados em termos de fertilidade. De facto, discrepâncias entre estudos podem ser explicadas pela utilização de diferentes técnicas de monitorização dos danos na cromatina, diferentes métodos de preparação dos espermatozóides, dados de fertilidade resultantes de diferentes técnicas de reprodução assistida, e no caso da técnica de ICSI (injecção intracitoplasmática de espermatozóides), existe ainda a subjectividade da selecção do espermatozóide utilizado³⁵. No entanto,

uma correlação negativa entre a percentagem de espermatozóides com fragmentação de ADN e as taxas de fecundação tem sido apontada nalguns estudos⁵. Outros autores demonstraram também que a presença de níveis elevados de espermatozóides com danos na cromatina afecta a taxa de desenvolvimento embrionário^{5,24,36,37} bem como a qualidade embrionária^{24,27,38}.

Por último, parece haver uma maior probabilidade de ocorrência de gravidez em indivíduos com baixos níveis de espermatozóides com danos na cromatina^{24,39,40,41,42}, mesmo quando se avaliam casais sem problemas de fertilidade^{43,44}. De facto, indivíduos com níveis de danos na cromatina considerados normais têm o dobro da probabilidade de obtenção de gravidez do que indivíduos com níveis elevados²⁴. Por outro lado, também tem sido discutida a possibilidade dos danos na cromatina dos espermatozóides levarem à ocorrência de efeitos não desejados na descendência, tais como alterações comportamentais ou redução da esperança média de vida³⁵. No entanto, são necessários mais estudos para validar (ou não) esta hipótese.

Métodos para Monitorizar a Integridade da Cromatina/ADN nos Espermatozóides

A integridade da cromatina/ADN dos espermatozóides pode ser avaliada usando diversas técnicas, com diferentes especificidades e analisando diferentes aspectos, tais como, a presença de fragmentação do ADN, a presença de histonas, o grau de descondensação da cromatina ou uma associação destes^{45,46,47}. As técnicas podem basear-se em métodos de fluorescência ou métodos colorimétricos.

A) Métodos de Fluorescência

- TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling) – este ensaio permite a detecção de quebras no ADN

de cadeia simples ou dupla, por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. A visualização é feita através da ligação enzimática (por uma enzima transferase) de nucleótidos modificados aos locais de quebra^{12,48}. Esta técnica é específica para a detecção de quebras no ADN, e portanto a sua avaliação tem uma baixa subjectividade, demonstrada pela consistência entre os resultados obtidos por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo¹².

- ISNT (in situ nick translation assay) – com este ensaio são especificamente detectadas quebras no ADN de cadeia simples. Semelhante à técnica de TUNEL, neste ensaio é usado uma enzima ADN polimerase para promover a ligação enzimática de nucleótidos aos locais de quebra⁴⁹. Desde que a técnica de TUNEL foi implementada em espermatozóides, o ISNT passou a ser menos utilizado, não tendo sido a técnica escolhida em estudos recentes.
- COMET (“single cell gel electrophoresis assay”) – este ensaio consiste na realização de uma eletroforese em gel de agarose utilizando lisados de ADN de espermatozóides. A visualização de quebras de cadeia de simples ou dupla de ADN é feita através da marcação do ADN com marcadores específicos por microscopia de fluorescência⁵⁰.
- CMA₃ (Guanine-cytosine-specific chromomycin A₃) – esta técnica permite monitorizar, por microscopia de fluorescência, a qualidade da compactação da cromatina através da visualização indirecta da deficiência em protaminas. O composto usado compete com as protaminas na ligação ao ADN sendo maior a ligação quanto maior a deficiência em protaminas³².
- SCSA (sperm chromatin structure assay) – esta técnica permite avaliar a estabilidade da cromatina em meio ácido. A marcação do ADN é

feita utilizando o laranja de acridina e a detecção é feita por citometria de fluxo. Espermatozóides com ADN intacto apresentam fluorescência verde enquanto espermatozóides com ADN fragmentado apresentam fluorescência laranja⁵¹. Juntamente com a técnica de TUNEL, o SCSA tem sido muito usado e considerado como técnica de referência. Vários estudos epidemiológicos, de larga escala, têm usado o SCSA para avaliar o impacto de contaminantes ambientais na integridade da cromatina^{52,53}.

- Teste de laranja de acridina (acridine orange test) – baseado no mesmo princípio de ligação que o descrito anteriormente para a técnica de SCSA. A detecção é feita através de uma marcação simples com laranja de acridina e de visualização por microscopia de fluorescência⁵⁴. No entanto, e apesar das semelhanças com o SCSA, têm sido descritas incompatibilidades entre o marcador e a superfície de vidro das lâminas, bem como uma elevada subjectividade na interpretação dos resultados⁵⁵.

B) Métodos Colorimétricos

Os testes colorimétricos foram desenvolvidos de modo a substituírem os métodos fluorescentes que requerem equipamentos dispendiosos tais como o citómetro de fluxo, o microscópio de fluorescência ou equipamento de electroforese.

- Azul de anilina – método de coloração simples. Este composto liga-se às histonas permitindo a visualização da presença destas proteínas e dando uma indicação indirecta do estado de condensação da cromatina⁵⁶.
- Azul de toluidina – método de coloração simples. Este corante básico liga-se ao ADN, sendo maior a marcação quanto maior for a exposição do ADN, facilitada quer pela presença de quebras no ADN, quer por descondensação da cromatina⁵⁷.

- SCD (sperm chromatin dispersion test) – técnica que permite avaliar a presença de espermatozoides com fragmentação no ADN. Após a remoção de proteínas nucleares e do ADN fragmentado por um tratamento com ácido e mistura com um meio de agarose, a presença de espermatozoides com ADN fragmentado é detectada através da visualização da ausência de formação de halos característicos em microscopia óptica⁵⁸.
- Teste baseado na coloração tipo Diff-Quik – método simples baseado no uso da coloração tipo Diff-Quik, utilizada e disponível na maioria dos laboratórios de andrologia para a avaliação da morfologia dos espermatozoides. Este método não envolve a realização de técnicas adicionais, nem necessita de reagentes para além dos já existentes num laboratório de andrologia, apenas se realiza uma avaliação adicional. Com este método, espermatozoides com quebras no ADN ou com cromatina descondensada apresentam uma coloração mais escura. Este método permite uma detecção rápida e reprodutível da integridade da cromatina, sendo portanto uma técnica com elevado potencial para ser usada em estudos epidemiológicos de larga escala (Figura 1)^{24,59}.

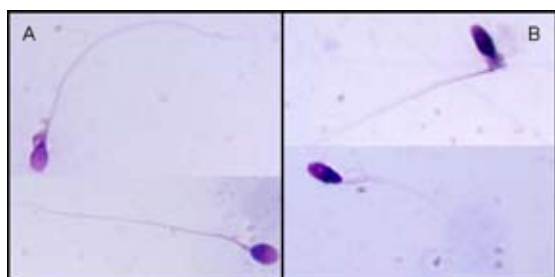


Figura 1 – Avaliação da integridade da cromatina em espermatozoides humanos pela técnica de coloração tipo Diff-Quik. (A) Espermatozoides com cromatina íntegra apresentam núcleos com uma coloração normal; (B) Espermatozoides com danos na cromatina possuem núcleos que apresentam uma coloração escura.

Apesar de diversos estudos demonstrarem a importância da avaliação da integridade da cromatina, e de na maioria destes testes, terem sido sugeridos valores de referência que permitam indicar a partir de que valor a fertilidade está afectada, este parâmetro não tem sido avaliado de forma rotineira nas clínicas de andrologia. Tal circunstância deve-se provavelmente ao facto das técnicas até agora existentes exigirem protocolos complexos e/ou requererem, na sua maioria, equipamentos (tais como o microscópio de fluorescência e o citómetro de fluxo) dispendiosos e inexistentes na maioria dos laboratórios de andrologia, impossibilitando a monitorização da integridade da cromatina durante a avaliação da qualidade espermática⁵⁵. Os testes colorimétricos até agora existentes também não têm sido usados nos laboratórios de andrologia, provavelmente por envolverem protocolos complexos e morosos e por utilizarem reagentes que normalmente não estão disponíveis nestes laboratórios. Com o desenvolvimento recente e validação de uma técnica simples, o teste baseado na coloração tipo Diff-Quik²⁴, que não requer reagentes nem equipamentos adicionais aos já existentes num laboratório de andrologia, será possível introduzir a avaliação da integridade da cromatina como um parâmetro rotineiro de qualidade seminal.

O uso de antioxidantes como arma terapêutica

É possível que a selecção de espermatozoides para ICSI implique a escolha de gâmetas com danos na cromatina, dado que há uma correlação entre os parâmetros seminais e a presença de danos na cromatina, e uma qualidade seminal extremamente baixa ser indicação para ICSI^{5,35}. Consequentemente, a utilização de espermatozoides com danos na cromatina pode resultar em taxas reduzidas de fecundação, de clivagem e de gravidez. Torna-se assim necessário por um lado avaliar os danos na

cromatina de forma rotineira como parâmetro da qualidade seminal, e por outro solucionar o problema e tentar reduzir os níveis de danos na cromatina. Para tal, vários estudos sugerem o uso de antioxidantes, que na maioria dos casos, resulta numa diminuição significativa dos danos na cromatina dos espermatozoides, nomeadamente de fragmentação do ADN (revisto por Greco et al.⁶⁰). De facto, quando se administra durante três meses uma mistura de antioxidantes, sendo na maioria dos estudos composta por Vitamina C e E entre outros, ocorre um aumento dos níveis de integridade da cromatina dos espermatozoides⁶¹, e um aumento de taxas de gravidez⁶². No entanto, existem doentes em que o tratamento com antioxidantes não é eficaz⁶³, provavelmente devido a diferenças na origem dos danos na cromatina.

CONCLUSÕES

A evidência disponível até à data indica que a integridade da cromatina dos espermatozoides é um parâmetro importante para a função dos gâmetas masculinos, reflectido quer na correlação com os parâmetros seminais, quer nas taxas de gravidez. Com o aparecimento de técnicas simples para avaliar a integridade da cromatina, como o teste baseado na coloração tipo Diff-Quik, é possível implementar a avaliação rotineira deste parâmetro. Por outro lado, serão necessários mais estudos para encontrar a metodologia a adoptar para diminuir o nível de danos na cromatina e consequentemente os seus efeitos nefastos na fertilidade. O uso de antioxidantes parece ser uma solução promissora para este problema.

AGRADECIMENTOS

APS apoiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/23571/2005).

REFERÊNCIAS

1. Ward WS and Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-74.
2. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298-305.
3. Courtens JL and Loir M. The spermatid manchette of mammals: formation and relations with the nuclear envelope and the chromatin. *Reprod Nutr Dev* 1981; 21: 467-77.
4. Evenson DP, Jost LK and Baer RK. Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *Environ Mol Mutagen* 1993; 21: 144-53.
5. Sun JG, Jurisicova A and Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
6. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J and Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245-50.
7. Gandini L, Lombardo F, Paoli D et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 830-9.
8. Barroso G, Morshedi M and Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1338-44.
9. Muratori M, Piomboni P, Baldi E et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21: 903-12.

10. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O and Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83.
11. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-38.
12. Varum S, Bento C, Sousa AP et al. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007; 87: 572-83.
13. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3: 1597-605.
14. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46.
15. Agarwal A, Saleh RA and Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-43.
16. Amaral S, Oliveira PJ and Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008; 4: 46-54.
17. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R and Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 2006; 66: 2056-67.
18. Marcon L and Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004; 70: 910-8.
19. Carrell DT and Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22: 604-10.
20. Bian Q, Xu LC, Wang SL et al. Study on the relation between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup Environ Med* 2004; 61: 999-1005.
21. Stronati A, Manicardi GC, Cecati M et al. Relationships between sperm DNA fragmentation, sperm apoptotic markers and serum levels of CB-153 and p,p'-DDE in European and Inuit populations. *Reproduction* 2006; 132: 949-58.
22. Long M, Stronati A, Bizzaro D et al. Relation between serum xenobiotic-induced receptor activities and sperm DNA damage and sperm apoptotic markers in European and Inuit populations. *Reproduction* 2007; 133: 517-30.
23. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9601-6.
24. Sousa AP, Tavares RS, Velez de la Calle JF et al. Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Hum Reprod* 2009; 24: 28-36.
25. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC and Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431-6.
26. Smith R, Kaune H, Parodi D et al. [Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from

- men examined for infertility. Relationship with oxidative stress]. *Rev Med Chil* 2007; 135: 279-86.
27. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 2008; 90: 1792-9.
 28. Banks S, King SA, Irvine DS and Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129: 505-14.
 29. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25: 255-61.
 30. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44.
 31. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ and Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27: 53-9.
 32. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864-7.
 33. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2009;
 34. Collins JA, Barnhart KT and Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823-31.
 35. Avendano C, Franchi A, Duran H and Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2009;
 36. Morris ID, Ilott S, Dixon L and Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990-8.
 37. Tesarik J, Greco E and Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004; 19: 611-5.
 38. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA and Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20: 3476-80.
 39. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M and 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: 2160-5.
 40. Benchaib M, Braun V, Lornage J et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1023-8.
 41. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 477-84.
 42. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET and Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895-902.
 43. Evenson DP, Jost LK, Marshall D et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.

44. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E and Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43-50.
45. Evenson DP, Larson KL and Jost LK. 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.
46. Sharma RK, Said T and Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139-48.
47. Agarwal A and Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005; 84: 850-3.
48. Sailer BL, Jost LK and Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; 16: 80-7.
49. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z. 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.
50. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK and 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: 231-7.
51. Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-3.
52. Spano M, Kolstad AH, Larsen SB et al. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepius. Hum Reprod* 1998; 13: 2495-505.
53. Bonde JP, Joffe M, Apostoli P et al. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002; 59: 234-42.
54. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ and Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87-91.
55. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW et al. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518: 253-68.
56. Dadoune JP, Mayaux MJ and Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988; 20: 211-7.
57. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J and Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 2001; 22: 45-53.
58. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R and Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.
59. Mota PC and Ramalho-Santos J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 2006; 65: 1360-75.

60. Ross C, Morriss A, Khairy M et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online*. In Press.
61. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S and Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26: 349-53.
62. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R and Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril* 2009; 92: 565-71.
63. Moskovtsev SI. Management of patients with high sperm DNA damage. *Indian J Med Res* 2008; 127: 101-3.