

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Hospital Clínico San Borja-Arriarán, Santiago Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Procesamiento de Imágenes (SCIAN-Lab), Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>a</sup>Tecnólogo Médico. <sup>b</sup>Magíster en Ciencias.

Biomédicas <sup>c</sup>Doctor en Ciencias.

Financiamiento: FONDEF D0711019/FONDECYT 1070756.

Recibido el 9 de septiembre de 2010, aceptado el 17 de enero de 2011.

Correspondencia a: Dra. Rosita Smith G. Santa Rosa 1234. Casilla 226-3. Santiago, Chile. Teléfono: 9770865. Fax: 56-2-4247246. E-mail: rsmith@med.uchile.cl

## Aumento del daño en el ADN espermático en varones mayores de 40 años

FABRIZIO HORTA<sup>1,a</sup>, MARCIA MADARIAGA<sup>1,a</sup>, ALEJANDRA GARCÍA<sup>2,a</sup>, STEFFEN HARTEL<sup>2,c</sup>, ROSITA SMITH<sup>1,b</sup>

### Association of age with sperm DNA fragmentation

**Background:** There is an association between aging and an increased number of sperms with alterations in nuclear DNA. **Aim:** To study the association between age and fragmentation of sperm DNA. **Material and Methods:** Sixty two volunteers provided semen for analysis. These were separated in a group aged less than forty years and a second group aged more than forty years. Sperm DNA fragmentation was studied by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick end-labeling) and SCD (sperm chromatin dispersion test) assays.

**Results:** Compared with their younger counterparts, patients aged more than 40 years had a higher proportion of sperms with DNA fragmentation by TUNEL ( $20 \pm 1.3$  and  $24 \pm 1.9\%$  respectively,  $p < 0.05$ ) and SCD ( $22 \pm 1.4$  and  $26 \pm 1.6\%$  respectively,  $p < 0.05$ ). The results of both assays had a correlation coefficient of 0.8. No differences between groups were observed for other seminal parameters. **Conclusions:** Sperm DNA fragmentation increases with age in males.

(Rev Med Chile 2011; 139: 306-312).

**Key words:** Aging; DNA fragmentation; Spermatozoa.

La postergación de la maternidad y de la paternidad es un fenómeno que se presenta cada vez con mayor frecuencia en el mundo y Chile no es una excepción al respecto. Una serie de factores socioeconómicos, que incluyen cambios en la conducta reproductiva, desarrollo laboral y profesional, mayor expectativa de vida, mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida han conducido a un paulatino, pero sostenido aumento en la edad en la que mujeres y hombres logran el primer embarazo.

La mayor edad paterna ha sido implicada en una variedad de alteraciones, reproductivas y genéticas, que incluyen: disminución de la calidad seminal<sup>1,2</sup>, aumento de la fragmentación del ADN en los espermatozoides eyaculados<sup>3-5</sup>, disminución de la fertilidad<sup>6-9</sup>, aumento de la frecuencia de abortos espontáneos<sup>10</sup> y mayor incidencia de algunas enfermedades genéticas<sup>11-14</sup>. Un creciente número de trabajos reportan una asociación entre la mayor edad en el varón y el aumento de espermatozoides eyaculados que presentan daño

en el ADN nuclear. Los mecanismos a través de los cuales se genera este daño no están completamente establecidos. Se sugiere, como posibles factores involucrados, a las alteraciones de la apoptosis testicular y a la disminución de los mecanismos de defensa antioxidante.

La fragmentación del ADN de los espermatozoides es considerada una causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia, en especial, cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida. En estos procedimientos no es posible realizar una selección espermática que permita excluir espermatozoides con daño genómico. Diversos estudios clínicos indican que el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN, está significativamente correlacionado con la tasa de embarazo tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>15-19</sup>. Estos estudios han definido valores de corte para algunos ensayos que permiten discriminar entre individuos fértiles e infértiles y pueden ser determinantes

en el tratamiento de la pareja infértil, como por ejemplo, en la recomendación del procedimiento de reproducción asistida más adecuado<sup>20</sup>.

Se han desarrollado varias técnicas, objetivas y reproducibles, para detectar rupturas de hebra simple o doble en el ADN espermático. Estas incluyen métodos directos, tales como, los ensayos de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick end-labeling*) y Cometa (*single-cell gel electrophoresis assay*) e indirectos como el análisis de la estructura de la cromatina (SCSA). Este último evalúa la susceptibilidad de los espermatozoides a la denaturación ácida, característica que es proporcional a la cantidad de rupturas de las hebras de ADN. En general, estas técnicas son complejas (citometría de flujo/microscopía de fluorescencia) y de alto costo, por esto su uso en clínica es limitado. Hasta ahora todos estos ensayos han demostrado una clara asociación entre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo<sup>21,22</sup> y apoyan su utilidad clínica. Recientemente, Fernández y col<sup>23,24</sup> desarrollaron una nueva técnica que permite evaluar la integridad del ADN. Se trata del ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD). Mediante un tratamiento ácido se induce la descondensación del ADN y los espermatozoides con ADN intacto son visualizados (mediante microscopía de campo claro) por la formación de un halo de dispersión alrededor de la cabeza. Los espermatozoides con ADN fragmentado no forman este halo de dispersión. El valor diagnóstico y pronóstico del SCD es controversial y no existen estudios rigurosos que comparen este ensayo con otras técnicas de detección de daño en el ADN espermático.

Los objetivos del presente estudio fueron:

1) Determinar si la mayor edad del varón se asocia a un aumento del daño en el ADN de los espermatozoides y 2) Correlacionar dos metodologías para diagnosticar fragmentación del ADN espermático: una de alta complejidad y costo como el ensayo de TUNEL y otra de baja complejidad como el SCD.

## Pacientes y Métodos

### Pacientes

El grupo estudiado incluyó 62 varones, entre 18 y 56 años, donantes voluntarios, de fertilidad

desconocida. En todos ellos se realizó un análisis seminal en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva del IDIMI, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y en el Centro de Diagnóstico y Tratamiento del Servicio de Salud Metropolitano Central (CDT), Hospital San Borja Arriarán. El grupo control estuvo constituido por 31 varones menores de 40 años y el grupo de estudio por 31 varones mayores de 40 años. Se excluyeron del estudio todos los sujetos que presentaron una concentración  $\leq$  a 5 millones de espermatozoides por ml (oligozoospermia severa) y un volumen seminal inferior a 0,5 ml. Tanto los donantes controles como los del grupo de estudio, dieron su consentimiento para participar en este proyecto, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Borja-Arriarán.

### Análisis seminal

En cada sujeto se realizó un análisis seminal siguiendo las recomendaciones de OMS<sup>25</sup>. Los parámetros seminales se consideraron normales cuando la concentración espermática fue  $\geq 20 \times 10^6$ /ml, la movilidad progresiva  $\geq 50\%$ , y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal estricta  $\geq 14\%$ <sup>26</sup>.

### Determinación del daño en el ADN de los espermatozoides

Se evaluó a través de los ensayos de TUNEL y de dispersión de la cromatina espermática (SCD).

*Ensayo de TUNEL.* Se utilizó el kit comercial "In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche, Mannheim, Alemania) y se procedió según las indicaciones del fabricante. El ensayo de TUNEL permite detectar los extremos 3' OH libres que se generan como consecuencia de las rupturas de las hebras de ADN (simple y doble). Los frotis, realizados a partir de suspensiones de espermatozoides lavados, libre de restos (PBS, pH 7.4), fueron fijados, permeabilizados e incubados en presencia de los nucleótidos marcados y de la enzima la enzima TdT (terminal deoxinucleotidil transferasa). Posteriormente, se realizó una contra-tinción con yoduro de propidio. Los espermatozoides fueron evaluados en un microscopio de fluorescencia (Nikon, 100X). En cada ensayo se analizaron 500 espermatozoides. Los espermatozoides con ADN fragmentado presentaron fluorescencia verde, los espermatozoides normales mostraron fluorescencia roja. En el control positivo los espermatozoides fueron pre-incubados con la enzima ADNasa I.

*Ensayo SCD.* Se utilizó como referencia el protocolo descrito por Fernández y col, 2003<sup>23</sup> y posteriormente patentado por Fernandez y col, 2005<sup>24</sup>. Los espermatozoides fueron suspendidos en una solución al 1% de agarosa de bajo punto de fusión y depositados en portaobjetos previamente tratados con agarosa. Posteriormente, los frotis fueron tratados con una solución ácida para denaturar el ADN y una solución de lisis para remover las proteínas nucleares y se contrastaron con la tinción de Wright. En respuesta a este tratamiento, los espermatozoides no fragmentados desarrollan un halo de dispersión de la cromatina que puede ser fácilmente visualizado a través de microscopía óptica de campo claro. Los espermatozoides fragmentados liberan fragmentos de ADN entre dos puntos de ruptura, se forma un halo muy pequeño y la mayor parte de la cromatina forma un centro compacto que se tiñe intensamente. En cada muestra se evaluaron 500 espermatozoides utilizando un microscopio de campo claro (Nikon). La presencia de un halo de cromatina dispersa (grande, mediano o pequeño) alrededor de la cabeza permite identificar los espermatozoides con ADN normal. Los espermatozoides con ADN fragmentado no presentan halo de dispersión de la

cromatina. Los controles positivos fueron tratados con ADN asa I.

### Estadística

Los resultados fueron analizados a través de los test de Mann-Whitney, test de t pareado o regresión lineal (GraphPadPrism® versión 4.0, San Diego CA). El nivel de significancia se estableció en 0,05.

### Resultados

Se estudió un total de 62 varones. La edad promedio del grupo control fue de 25 años (rango 17-35 años), mientras que las edades del grupo de estudio fluctuaron entre los 40 y 56 años con una edad promedio de 48 años.

Las características seminales de los grupos estudiados se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los valores promedios de los parámetros seminales convencionales. Sin embargo, 23% de los individuos mayores presentaron valores anormales ( $< 14\%$ ) de morfología estricta. En el grupo control este valor fue de sólo 10%.

En la Tabla 2 se comparan los porcentajes pro-

**Tabla 1. Características seminales en sujetos controles e individuos mayores**

	Grupo Control		Grupo de estudio	
	Promedio	(Rango)	Promedio	(Rango)
Edad	25 ± 0,8 <sup>a</sup>	(17 – 35)	48 ± 0,7	(40 – 56)
Volumen (ml)	3,1 ± 0,23	(0,9 – 6,0)	2,8 ± 0,25	(0,5 – 5,8)
Concentración (millón/ml)	98 ± 11	(27 – 220)	88 ± 14	(10 – 290)
Movilidad progresiva (%)	68 ± 1,5	(52 – 84)	65 ± 2,5	(20 – 84)
Células redondas (millón/ml)	2,3 ± 0,39	(< 1 – 8,0)	1,3 ± 0,17	(< 1 – 5,6)
Morfología normal estricta (%)	18 ± 0,84	(7 – 27)	17 ± 1,0	(5 – 27)

Los valores representan promedios ± error estándar (EE).<sup>a</sup>Diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 2. Porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado**

Ensayo	Grupo Control		Grupo de estudio	
	Promedio	(Rango)	Promedio	(Rango)
TUNEL	20 ± 1,3 <sup>a</sup>	(8 – 37)	24 ± 1,9	(10 – 55)
SCD	22 ± 1,4 <sup>b</sup>	(7 – 53)	26 ± 1,6	(14 – 60)

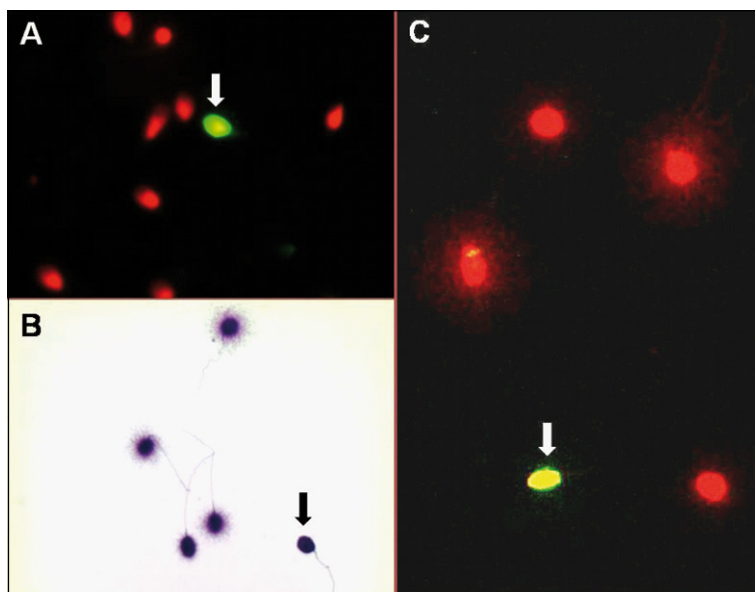
Datos expresados en promedio ± EE. <sup>a</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre controles y sujetos mayores ( $p < 0,05$ ).  
<sup>b</sup> $p = 0,05$ .

medio (y rangos) de espermatozoides con ADN fragmentado, evaluados a través de los ensayos de TUNEL y SCD en ambos grupos de pacientes. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en el nivel de daño en el ADN en el grupo de varones mayores de 40 años.

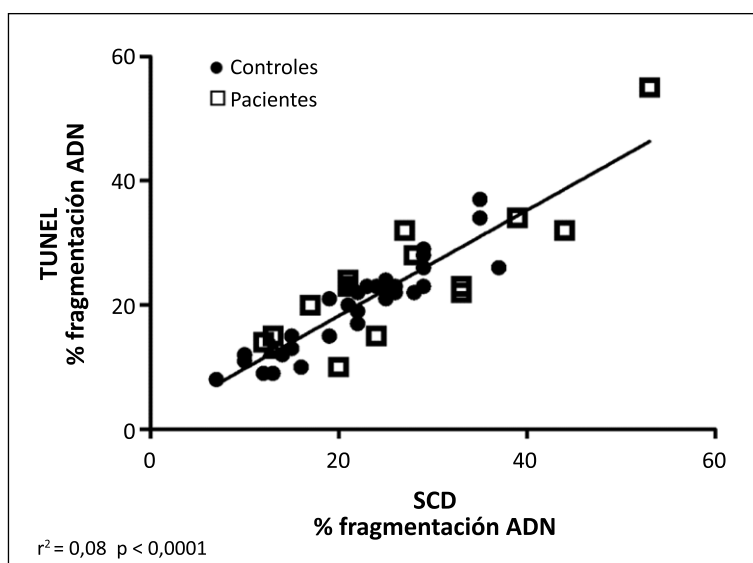
En la Figura 1 se muestran microfotografías de espermatozoides con ADN normal y fragmentado evaluados a través de los ensayos de TUNEL (A)

y SCD (B). Al realizar ambos ensayos simultáneamente sobre la misma placa, utilizando microscopía confocal, las células positivas para TUNEL se observaron sólo en aquellos espermatozoides que no presentaban halo (fragmentados).

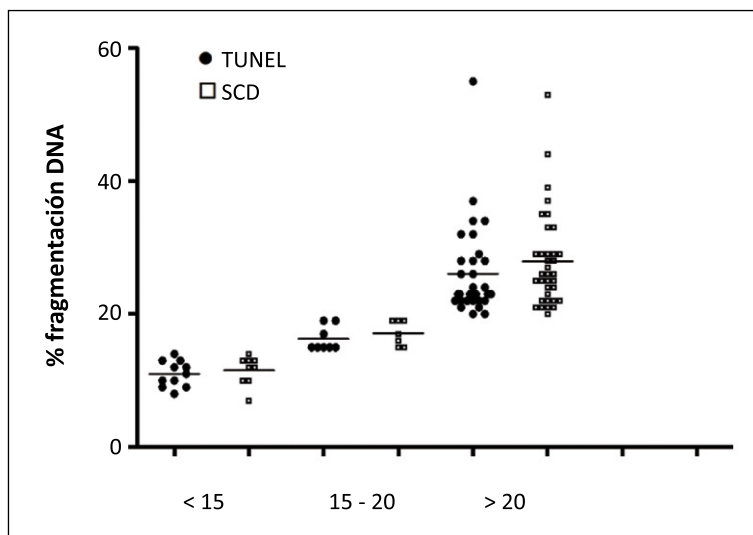
Al relacionar los porcentajes de daño en el ADN, evaluados a través de las técnicas de TUNEL y SCD, se observó una correlación positiva significativa entre ambos ensayos (Figura 2).



**Figura 1.** Microfotografías de espermatozoides con ADN normal y fragmentado. **A.** Ensayo de TUNEL a través de Microscopía de Fluorescencia (1000X). **B.** Ensayo de SCD. Microscopía de Campo Claro (400x). **C.** TUNEL y SCD simultáneamente sobre la misma muestra a través de Microscopía Confocal (1000x). Las flechas indican espermatozoides con ADN fragmentado. Los círculos muestran los halos de cromatina dispersa.



**Figura 2.** Correlación entre los ensayos de TUNEL y SCD en sujetos controles e individuos mayores.



**Figura 3.** Comparación de los porcentajes de fragmentación del ADN de acuerdo a los valores de normalidad. Valores de normalidad (15-20%) establecidos para el ensayo de TUNEL.

Estudios recientes de Sakkas y Álvarez<sup>27</sup> y de nuestro grupo<sup>19</sup> han establecido un límite de corte de fragmentación del ADN (TUNEL) de entre 15% y 20%. Valores superiores a 20% de espermatozoides con ADN fragmentado se considera anormal y se correlaciona con infertilidad.

La Figura 3 representa la distribución de los resultados, de acuerdo al porcentaje de fragmentación del ADN, obtenidos a través de TUNEL y SCD. Para analizar esta distribución se usaron 51 muestras. En 10 individuos, tanto del grupo control como de estudio, no pudimos realizar ambos ensayos simultáneamente. El número de sujetos que presentaron valores de fragmentación  $\leq 15\%$ , entre 15 y 20% y  $\geq 1 20\%$  fue similar para TUNEL y SCD.

### Discusión

El efecto de la edad paterna sobre la fertilidad constituye actualmente un tópico de interés en salud pública, debido a que las estadísticas de nacimiento demuestran que un número cada vez mayor de varones escogen ser padres a edades más avanzadas ( $> 40$  años)<sup>28</sup>.

Una característica particular del semen humano es su baja calidad, que se manifiesta en una alta proporción de espermatozoides de baja movilidad, mala morfología y una alta incidencia de daño en el ADN nuclear y mitocondrial. Diversos

estudios clínicos indican que el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN, está significativamente correlacionado con la tasa de embarazo tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>15,17,18</sup>. Algunos de estos estudios han definido valores de corte, para algunos ensayos, que permiten discriminar entre individuos fértiles e infértiles y pueden ser determinantes en el tratamiento de la pareja infértil, como por ejemplo, en la recomendación de un procedimiento de reproducción asistida más adecuado.

La determinación de la fragmentación del ADN agrega información de mayor valor predictivo al análisis de semen convencional y la evidencia de la literatura parece justificar que el análisis de este parámetro debería incluirse en la evaluación de rutina de la infertilidad masculina en las siguientes situaciones: (i) parejas infértiles con factor masculino alterado o infertilidad idiopática; (ii) pacientes con alteraciones endocrinas/andrológicas que requieren evaluación en respuesta a determinados tratamientos; (iii) pacientes de edad avanzada que consultan por infertilidad; (iv) pacientes con indicación de reproducción asistida de alta complejidad y (v) muestras de espermatozoides criopreservadas.

El objetivo de este estudio fue determinar si la integridad del ADN espermático se modifica con la edad del individuo. Nuestros resultados demostraron un aumento significativo de este daño en varones mayores de 40 años. En el grupo control, el

límite superior de espermatozoides fragmentados fue de 37%. En el grupo mayor, 68% de los varones presentaron porcentajes de fragmentación mayores al rango normal de referencia (20% TUNEL +), con un límite superior de 55% de espermatozoides dañados. El promedio de los parámetros seminales convencionales fueron similares en ambos grupos.

La asociación entre el aumento de daño genómico en los espermatozoides y la edad del varón constituye en la actualidad un tópico de gran interés debido al riesgo potencial de transmitir el daño genético a la descendencia<sup>3,5</sup>. Wyrobeck y col, en un grupo bien caracterizado (no fumador) de 97 varones entre 22 y 80 años demostraron una clara asociación entre el incremento de la edad del individuo, porcentaje de fragmentación del ADN, daño a la cromatina y mutaciones genéticas. Mientras que la incidencia de aneuploidías/diploidías no se asoció con la edad del varón<sup>4</sup>. Por otra parte, Slotter y col, utilizando una nueva estrategia de hibridización del ADN (*ACM sperm FISH assay*), demostraron que la edad paterna avanzada se asociaba a una mayor incidencia de rupturas, duplicaciones y deleciones del cromosoma 1 (particularmente 1p36 y 1q12) en los espermatozoides<sup>29</sup>. Se ha reportado que 80% de las anomalías cromosómicas estructurales que se manifiestan durante el desarrollo o al nacimiento son de origen paterno<sup>30-32</sup>. Recientemente, Belloc y col<sup>10</sup> demostraron, en 17.000 ciclos de inseminación intrauterina, que no sólo la edad materna avanzada sino también la paterna tenían un profundo impacto negativo en las tasas de embarazo y aborto con diferencias significativas a partir de los 40 años.

En el presente estudio, la fragmentación del ADN nuclear se determinó a través de los ensayos de TUNEL y SCD. El TUNEL es ampliamente utilizado en la literatura y en general existe consenso, que porcentajes superiores a 20% de espermatozoides positivos para TUNEL se asocian a ausencia de embarazo con 100% de especificidad<sup>33</sup>. Esta técnica utiliza microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, estas son metodologías complejas y de alto costo lo que limita su uso en el laboratorio de diagnóstico de rutina. Recientemente, un grupo español<sup>24</sup> desarrolló el ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD) que utiliza microscopía de campo claro disponible en cualquier laboratorio. Ambos ensayos presentan la ventaja adicional que permiten evaluar cada es-

permatozoide de la población en forma individual pudiendo aplicarse a muestras con bajo número de espermatozoides. Al comparar los resultados obtenidos por TUNEL y SCD, en la misma muestra, se observó que esta nueva técnica se correlaciona positiva y significativamente con ensayos de mayor complejidad y costo como el TUNEL. Aun cuando faltan estudios para establecer los valores de referencia que permitan discriminar pacientes fértiles de infértiles, su implementación en el estudio de rutina del factor masculino de infertilidad, mejorará el valor predictivo de los espermiograma convencionales aplicados en Chile.

### Conclusión

La tendencia actual a ser padres en la madurez se asocia a una disminución de la integridad genética de los espermatozoides. Los individuos mayores de 40 años presentaron un aumento de la fragmentación en el ADN espermático que podría explicar la reducción de la fertilidad reportada en este grupo etario.

La metodología de SCD es sencilla de realizar, rápida y requiere de instrumentos de laboratorio de fácil acceso. Además, es de bajo costo y se correlaciona con técnicas existentes de mayor complejidad y costo.

### Referencias

1. Ng K, Donat R, Chan L, Lalak A, DiPierro I, Handelsman D. Sperm output of older men. *Hum Reprod* 2004; 19: 1811-5.
2. Levitas E, Lunefeld E, Weisz N. Relationship between age and semen parameter in men with normal sperm concentration: analysis of 6.022 semen samples. *J Comp* 2007; 39: 45-50.
3. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420-30.
4. Wyrobeck A, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs E, et al. Advancing age has differential effect on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9601-6.
5. Schmid T, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007; 22: 180-7.

6. Ford W, North K, Taylor H. Increasing paternal age in associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of pregnancy and childhood). *Hum Reprod* 2000; 15: 1703-8.
7. Kidd S, Eskenazi B, Wyrobeck A. Effect of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001; 75: 237-48.
8. De La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age > or = 40 years: an important risk factor for infertility. *Am J Gynecol* 2003; 189: 901-5.
9. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25: 255-61.
10. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Chohen-Bacrie M, De Mouzon J, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biol* 2008; 17: 392-9.
11. Zhu JL. Paternal age and congenital malformations. *Hum Reprod* 2005; 20: 3173-7.
12. Yang Q, Wen SW, Leader A, Chen XK, Lipson J, Walker M. Paternal age and birth defects: how strong is the association? *Hum Reprod* 2007; 22: 696-701.
13. Malaspina D, Corcoran C, Fahim C, Berman A, Harkavy-Friedman J, Yale S, et al. Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet* 2002; 114: 299-329.
14. Nybo AM, Hansen KD, Andersen PK, Smith GD. Advanced Paternal Age and Risk of Fetal Death: A Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 1214-22.
15. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.
16. Carrel 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: 49-55.
17. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823-31.
18. Zini A, Sigman M. Are test of sperm DNA damage clinically useful?: Pros and Cons. *J Androl* 2009; 30: 219-29.
19. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Ríos R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21: 986-93.
20. Tesarik J, Mendoza-Tezari R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biol* 2006; 12: 715-21.
21. Borini A, Tarozzi N, Bizarro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; 21: 2876-81.
22. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83.
23. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 4: 59-66.
24. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84: 833-41.
25. World Health Organization. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction* 1999. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge, p 1-128.
26. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112-7.
27. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1027-36.
28. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Kirmeyer S. Births: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 2006; 55: 1-101.
29. Slotter E, Marchetti F, Eskenazi B. Frequency of human sperm carrying structural aberration of chromosome 1 increases with advancing age. *Fertil Steril* 2007; 87: 1077-86.
30. Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobeck AJ, Jabs EW. The paternal-age effect in apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 939-47.
31. Crow JF. Development. There's something curious about paternal-age effects. *Sci* 2003; 301(5633): 606-7.
32. Goriely A, McVean GA, Rojmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Sci* 2003; 301(5633): 643-6.
33. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a Test for sperm DNA damage in the Evaluation of Male Infertility. *Urol* 2010; Jun 21.