

## Variaciones intraindividuo del índice de fragmentación del ADN espermático Intraindividual variations of the sperm DNA fragmentation index

Rocío Núñez Calonge (PhD)<sup>a</sup>, José Andrés Guijarro (MD)<sup>b</sup>, Susana Cortés (PhD)<sup>c</sup>, Pedro Caballero (MD)<sup>a</sup>, Jaime Gosálvez (MD)<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Fundación IERA, Madrid, Spain; UR International Reproduction Unit.

<sup>b</sup>Hospital Virgen de la Luz, Gynecology Unit, Cuenca, Spain

<sup>c</sup>Clínica Tambre, Reproduction Unit, Madrid, Spain

<sup>d</sup>Unidad de Genética, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

### RESUMEN

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo es analizar y comparar las fluctuaciones del índice de fragmentación en dos poblaciones de varones: donantes de semen de fertilidad probada, y pacientes que acuden para realizar estudio de fertilidad. En ambos casos se determinan las variaciones intra e inter- individuo a lo largo del tiempo.

**Material y métodos:** Se realizó una determinación de la fragmentación de ADN mediante el kit Halosperm al eyaculado de 69 varones, de los cuales 18 eran candidatos para participar en un programa de donación de semen y 51 acudían a la clínica con su pareja por un problema de fertilidad. Tras esta primera determinación, los individuos fueron divididos en tres grupos según el grado de fragmentación de

Aceptado: 4-Marzo-2021

Correspondencia: Rocío Núñez-Calonge

e-mail: rocioncalonge@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6194-1598>

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

su muestra seminal y se realizó un seguimiento durante seis meses con entre cuatro y seis nuevas determinaciones de fragmentación de ADN en otras tantas nuevas muestras de semen. Para estimar la variabilidad interindividual, se calculó la desviación estándar de la media de los valores de la primera muestra seminal de los 69 individuos incluidos en el estudio. Para el cómputo de la variación intraindividual, se calculó la media de la dispersión de cada sujeto mediante la desviación estándar respecto a la media del conjunto de todas sus muestras examinadas de aquellos individuos que tenían al menos cuatro muestras analizadas. Para poder comparar el grado de dispersión entre grupos con valores de medias muy diferentes, se calculó también en todos los casos el Coeficiente de Variación (CV), mediante la fórmula:  $CV=DS*100/media$ .

**Resultados:** El análisis de la primera muestra resultó en una distribución con una media de 31,74 y una SD de 14,14, con una variabilidad intraindividual (calculada mediante el CV) de 0,45 ó 45 %.

La media de las 4,8 muestras analizadas para cada individuo mostró una media de IF de 30,49 % con una SD de 8,76 % y una variabilidad intraindividual (CV) de 0,33 ó 33 %.

**Conclusión:** A la hora de establecer puntos de corte aplicables a la práctica clínica diaria es preciso tener en cuenta la importancia de la elevada variabilidad intraindividual en la fragmentación del ADN de diferentes muestras de su semen.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 38; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras clave:** *Fragmentación de ADN, variación intraindividual, variación interindividual, semen, fertilidad masculina*

## SUMMARY

**Background:** The aim of this study was to analyse and compare both, inter and intra individual baseline Sperm DNA fragmentation (SDF) fluctuations in two different groups of men: 1) those attending an infertility clinic for the purpose of seminal analysis and 2) those fertile individuals that donate semen for assisted reproduction techniques.

**Material and Methods:** Semen samples from 51 patients (Patient Sample-PS) (n=145) attending an infertility clinic and from 18 healthy donors (Donor Sample-DS) (n=128) providing semen for an artificial insemination program were included in this analysis. Between 4 and 6 SDF measurements per subject were performed. SDF fragmentation was assessed using the Halosperm kit (Halotech DNA, Madrid, Spain). To estimate the interindividual variability, the standard deviation of the mean of the values of the first seminal sample of the 69 individuals included in the study was calculated. For the computation of the intra-individual variation, the mean of the dispersion of each subject was calculated by means of the standard deviation with respect to the mean of the set of all their examined samples of those individuals who had at least four samples analysed. The coefficient of variation (CV) for sperm DNA Fragmentation (SDF) was calculated using the formula  $(SD/mean) \times 100$ .

**Results:** The analysis of the first sample resulted in a distribution with a mean of 31.74 and an SD of 14.14, with an intra-individual variability (calculated by CV) of 0.45 or 45%.

The mean of the 4.8 samples analyzed for everyone showed a mean IF of 30.49% with an SD of 8.76% and an intra-individual variability (CV) of 0.33 or 33%.

**Conclusion:** When establishing cut-off points applicable to daily clinical practice, it is necessary to consider the importance of the high intraindividual variability in DNA fragmentation of different samples of your semen.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 38; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Key words:** *DNA fragmentation, intraindividual variation, interindividual variation, semen, male fertility.*

## INTRODUCCIÓN

La fragmentación del ADN espermático se considera un parámetro importante de calidad seminal, y se utiliza como predictor de la fertilidad masculina (1). Diversas publicaciones indican que los varones infértiles tienen más defectos en el ADN y la cromatina que los controles fértiles (2, 3). De esta forma, los datos existentes parecen justificar un análisis cuantitativo del daño de ADN en la evaluación de rutina del varón infértil (1, 4-6).

Es bien conocido que determinados parámetros espermáticos tales como concentración, movilidad y morfología, son altamente variables en el tiempo (7-11). Muestras de semen que se analizan a distintos tiempos pueden mostrar un alto grado de variación de esos parámetros espermáticos de una muestra a otra (variación inter-muestra) (9), lo cual puede afectar el potencial de fertilidad (11).

La variación en los valores del índice de fragmentación (IF)

---

muestra resultados contradictorios en la literatura, y mientras que algunos estudios publican bajos niveles de variación intraindividual a lo largo del tiempo (12,13), en otros casos sí se muestra una variación (14).

Los factores conocidos para estas variaciones son factores externos tales como consumo de drogas o episodios febriles (13).

En cualquier caso, se han realizado pocos estudios para verificar la estabilidad del ADN espermático en protocolos longitudinales. Esta falta de congruencia parece asumible ya que la estandarización de los protocolos entre distintos laboratorios para comparar resultados puede ser la causa de esta disparidad. Es necesario por ello, analizar las muestras en el mismo laboratorio, con los mismos métodos, para evitar los sesgos.

El objetivo de este trabajo es analizar y comparar las fluctuaciones del índice de fragmentación en dos poblaciones de varones: donantes de semen de fertilidad probada, y pacientes que acuden para realizar estudio de fertilidad. En ambos casos se determinan las variaciones intra e inter-individuo a lo largo del tiempo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Participantes del estudio*

Se realizó un estudio básico morfológico y una determinación de la fragmentación de ADN al eyaculado de 69 varones, de los cuales 18 eran candidatos para participar en un programa de donación de semen y 51 acudían a la clínica con su pareja por un problema de fertilidad. Tras esta primera determinación, los individuos fueron divididos en tres grupos según el grado de fragmentación de su muestra seminal y se realizó un seguimiento durante seis meses con entre cuatro y seis nuevas determinaciones de fragmentación de ADN en otras tantas nuevas muestras de semen (6 en el caso de los donantes y entre dos y seis en el caso de los pacientes (media: 2,84 muestras por paciente). En todos los casos, el intervalo entre determinaciones fue de un mes.

Los donantes (media de edad 24 años, rango: 22-29), cumplieron un protocolo estandarizado que incluyó análisis de semen, examen médico, historia familiar y personal y estudios genéticos y de enfermedades infecciosas. Antes de su participación en el proyecto, cada donante firmó un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Hospital de La Princesa de Madrid. En cada visita, el donante rellenó un cuestionario en el cual se anotaba el momento de la última eyaculación. A cada donante se le preguntó si había sucedido algún evento inusual desde la última visita al laboratorio tales como episodios febriles, condiciones de estrés, medicamentos, drogas, suplementos

vitamínicos, o algún cambio en sus hábitos de vida. En caso afirmativo de cualquiera de estos sucesos, se excluyó al donante del estudio.

Los pacientes (media de edad: 34 años, rango: 30-41), acudieron a la clínica para un estudio de esterilidad previo a un tratamiento de reproducción asistida. Se incluyeron únicamente los varones que no habían consumido drogas, suplementos vitamínicos y que no hubieran tenido episodios de fiebre en los últimos tres meses. En este grupo, los pacientes firmaron también el correspondiente consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética.

En ambos grupos, pacientes y donantes, la muestra de semen se recogió por masturbación después de un período de abstinencia entre 3 y 5 días. El análisis de semen se realizó de acuerdo con el manual de la OMS (17) inmediatamente después de la licuación, a temperatura ambiente y se determinó la concentración, movilidad y morfología espermáticas.

### *Determinación de la fragmentación de ADN*

La fragmentación del ADN se analizó de forma inmediata a la obtención de la muestra en el tiempo correspondiente. En todos los casos se utilizó la metodología Sperm Chromatin Dispersion (SCD) utilizando el kit Halosperm (Halotech DNA SL, Madrid, Spain; Conception Technologies, San Diego, CA, USA) (18).

Las muestras de semen se diluyeron hasta alcanzar una concentración de entre 5 y 10 millones de espermatozoides por mililitro. Las muestras procesadas con Halosperm se tiñeron para ser visualizadas con microscopía de fluorescencia utilizando una combinación de fluorocromos para teñir el ADN en rojo/verde (Gel-Red/Eva Green –Biotium, USA) y para las proteínas en verde (Mercuribromofluoresceína, Sigma, USA). El conteo se realizó en 300 espermatozoides utilizando un microscopio motorizado Leica DMLB que elegía los campos en un microscopio al azar según un movimiento de coordenadas predefinido. Los datos se procesaron en Excell (Microsoft, USA) y los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows v. 11,5. La representación gráfica de los resultados se realizó con Apple Keynote<sup>®</sup> 4.0.4 y Apple grapher<sup>®</sup> 2.0 para la elaboración de las curvas de regresión logística.

El SCD utiliza un tratamiento doble encaminado a producir, primero una desnaturalización del ADN, utilizando como punto de partida las roturas presentes en la molécula de ADN, que bien afecten a doble cadena o a cadena sencilla, y segundo un tratamiento de desproteización controlada que retira la mayor parte de las proteínas nucleares. Tras la tinción, los espermatozoides que presentan el ADN frag-

mentado no presentan un halo visible de dispersión de la cromatina o si lo hacen este es de muy pequeño tamaño. Los espermatozoides que presentan un halo de dispersión grande se consideran normales para el nivel de fragmentación.

El IF (índice de fragmentación) se definió como el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado, obtenidos tras estudiar 800 espermatozoides en cada muestra.

### Análisis de los datos

Los resultados se han expresado como media ( $\pm$ DS). El coeficiente de variación (CV) para la fragmentación de ADN se calculó usando la fórmula:  $(DS/media) \times 100$ .

De acuerdo con publicaciones previas que sugieren un punto de corte para el IF del 30 % para conseguir un embarazo (19), los sujetos del estudio fueron divididos en tres grupos, de acuerdo con el primer valor de IF:  $IF > 30\%$ ,  $20\% < IF < 30\%$  e  $IF < 20\%$ .

Para estimar la variabilidad interindividual, se calculó la desviación estándar de la media de los valores de la primera muestra seminal de los 69 individuos incluidos en el estudio. Para el cómputo de la variación intraindividual, se calculó la media de la dispersión de cada sujeto mediante la desviación estándar respecto a la media del conjunto de todas sus muestras examinadas de aquellos individuos que tenían al menos cuatro muestras analizadas. Para poder comparar el grado de dispersión entre grupos con valores de medias muy diferentes, se calculó también en todos los casos el Coeficiente de Variación (CV), mediante la fórmula:  $CV = DS * 100 / media$ .

La comparación de medias se realizó con una prueba T-Student

de dos colas, considerado como significativo con un valor de probabilidad inferior a 0,05. Los análisis se realizaron utilizando SPSS 20.0 para OS (SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

Se analizaron un total de 128 muestras de semen en el grupo de los donantes y 145 en el de los pacientes. Se encontraron diferencias significativas en la edad, concentración espermática, movilidad progresiva e índice de fragmentación entre los dos grupos, pero no en los días de abstinencia (Tabla 1).

El análisis de la primera muestra resultó en una distribución con una media de 31,74 y una SD de 14,14, con una variabilidad intraindividual (calculada mediante el CV) de 0,45 ó 45 %

La media de las 4,8 muestras analizadas para cada individuo mostró una media de IF de 30,49 % con una SD de 8,76 % y una variabilidad intraindividual (CV) de 0,33 ó 33 %.

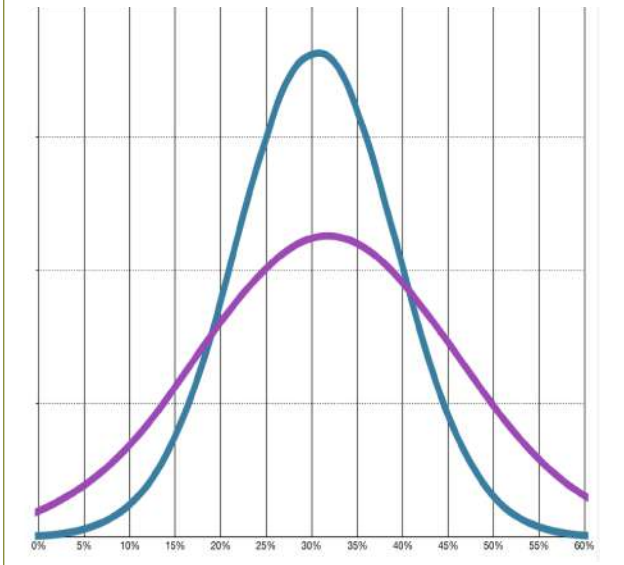
La gráfica 1 muestra la distribución del modelo de normalidad que describe la fragmentación en las primeras muestras analizadas de los 69 pacientes incluidos en el estudio (variabilidad interindividual) y la media de distribución de las diferentes muestras obtenidas a cada uno de los 69 individuos (variabilidad intraindividual). La menor variabilidad intraindividual supone que repetidas muestras de un mismo individuo tenderán a estar más próximas al valor de una primera determinación que las realizadas a otros individuos diferentes. Sin embargo, con ser esto un requisito indispensable para poder utilizar una determinación como

TABLA 1				
Características clínicas de los dos grupos incluidos en el estudio: pacientes y donantes de semen. Se encontraron diferencias significativas en la edad, concentración espermática, movilidad progresiva e índice de fragmentación entre los dos grupos, pero no en los días de abstinencia.				
media +/- DS	Donantes	Pacientes	t-value	p-value
n (muestras)	128	145		
Edad	24 $\pm$ 4,3	34 $\pm$ 5,8	3,33	<0,01
Tiempo abstinencia	3,6 $\pm$ 2,3	4,2 $\pm$ 2,1	2,13	0,43
Concentración espermática	89,9 $\pm$ 45,8 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml	23,4 $\pm$ 15,8 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml	97,34	<0,01
Recuento espermático total	306,4 $\pm$ 171,2 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides	98,3 $\pm$ 45,2 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides	162,04	<0,01
Movilidad progresiva	62,3 $\pm$ 16,4 %	32,3 $\pm$ 12,4 %	64,90	<0,01
IF (índice fragmentación)	10,1 $\pm$ 9,8 %	32,4 $\pm$ 11,4 %	56,61	<0,01

### GRÁFICA 1

En violeta se representa la distribución del modelo de Normalidad que describe la fragmentación en las primeras muestras analizadas de los 69 individuos incluidos en el estudio (variabilidad inter-individuo) Media de 31,74 y una DS de 14,14, con una variabilidad inter-individuo (calculada mediante el CV) de 45%.

En azul se muestra la media de la distribución de las diferentes muestras /entre 4 y 6) obtenidas a cada uno de los 69 individuos (variabilidad intra-individuo). (Media de IF de 30,49% con una DS de 8,76% y una variabilidad intra-individuo (CV) de 33%



prueba diagnóstica o, meramente, como elemento diferenciador de un individuo respecto al resto de individuos de una misma población, la variabilidad intraindividual sigue siendo considerablemente elevada (con un coeficiente de variación de un 33 % de la media). Por ello, para poder evaluar su utilidad discriminadora en la práctica clínica es necesario evaluar la capacidad pronóstica o la estabilidad de los valores de una primera determinación en los valores de muestras sucesivas de un mismo individuo. Más aún cuando en la práctica clínica se tiende a establecer puntos de corte rígidos que convierten con una sola determinación a una muestra en normal o alterada y, especialmente, cuando este punto de corte (habitualmente SDF: 0,3 ó 30 %), está tan próximo a la media de la población (en nuestro caso SDF:31,74 %).

Para poder ilustrar las consecuencias en la práctica clínica de tal variabilidad intraindividual se seleccionaron los 69 individuos en función del valor del IF obtenido en una primera muestra seminal en tres grupos con puntos de corte en 20 y 30 % y se compararon los resultados de IF obtenidos en una segunda muestra en cada individuo.

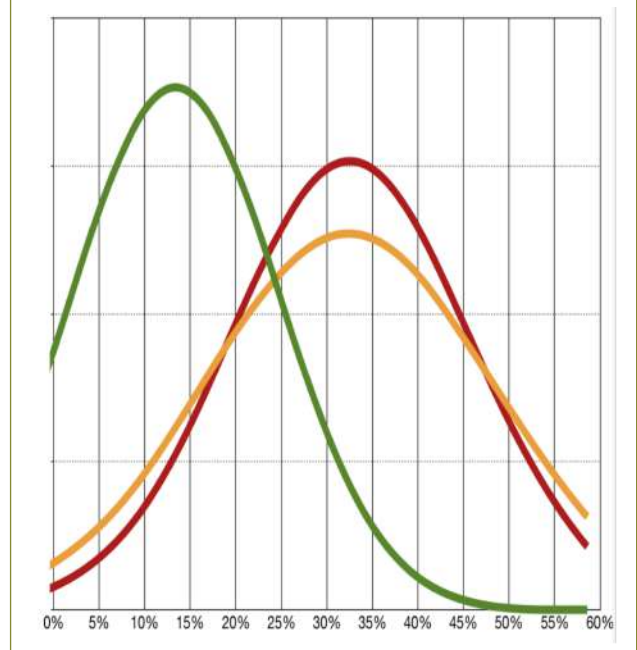
En el subgrupo A cuyos valores en una primera determinación fue menor del 20 % (media: 7,04 % DS:4,80), la fragmentación encontrada en una segunda muestra fue significativamente peor que en la primera, pero en todos los casos manteniéndose dentro de la normalidad (media: 13,38 % DS:11,30 t-value:7,07 p <0,001) (Gráfica 2).

Sin embargo, en los subgrupos marcados por una fragmentación en la primera determinación entre 20 y 30 % (Grupo B. media: 26,41 % DS: 3,26) o superior al 30 % (Grupo C. media: 42,42 % DS:8,95) los resultados de una segunda determinación fueron prácticamente similares entre ellos, sin que el valor de la primera pudiera discriminar o pronosticar si la segunda muestra se consideraría normal o alterada en función de su grado de fragmentación. Así en la segunda determinación de los sujetos incluidos en el grupo B el IF fue de 32,35 % /DS:15,69) y en el grupo C de 32,53 % (DS:13,16) (t-value:0,15 p:0,88 n.s.) (Gráfica 2).

### GRÁFICA 2

En verde se muestra el grupo A (menos de 20% de fragmentación en muestra previa), Grupo B en rojo (entre 20 y 30%), y Grupo C en amarillo (más de 30%).

En el subgrupo A cuyos valores en una primera determinación fue menor del 20% la fragmentación encontrada en una segunda muestra fue significativamente peor que en la primera, pero en todos los casos manteniéndose dentro de la normalidad (media: 13,38% SD:11,30 t-value:7,07 p-value<0,001). En la segunda determinación de los sujetos incluidos en el grupo B el IF fue de 32,35 % /SD:15,69) y en el grupo C de 32,53% (SD13,16) (t-value:0,15 p-value:0,88 n.s.)



## DISCUSIÓN

Algunos estudios han establecido que la fragmentación de ADN está sujeta a variabilidad biológica, aunque de forma más leve que ocurre con los parámetros clásicos de semen (13,20). No obstante, un estudio publicó una variación intraindividual significativa en varones infértiles, con un CV del 30 % (14), equivalente a la magnitud de la variación inter-individuo descrita para otros parámetros de semen (15,16).

En nuestro estudio, el análisis de la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de Halosperm nos permite cierta caracterización y clasificación de los sujetos en función de sus resultados porque la estabilidad de éstos en varias muestras repetidas a lo largo de varios meses mantiene una variabilidad intraindividual significativamente inferior a la variabilidad interindividual observada en una muestra de individuos diferentes, tanto pacientes como donantes. Sin embargo, esta variabilidad intraindividual, aun siendo inferior a la interindividual, es lo suficientemente elevada como para obligar a extremar la precaución y evitar la tendencia de asignar una categorización de fragmentación normal o alterada a un individuo en base a una única muestra de semen analizada y un único umbral o punto de corte, especialmente si este se encuentra cerca de la media de los valores en la población. Estos resultados son consistentes con los publicados por Oleszczuk y col (12), que llevaron a cabo repetidos análisis de fragmentación de ADN mediante el método SCSA en 616 muestras, calculando el coeficiente de variación. En su estudio, mostraron que los pacientes tenían un alto CV, pero afirmaron que era más importante la proporción de sujetos que cambiaban a más o menos de un 30 % de IF que su CV intraindividual. Por ello, concluían que el SCSA tenía un alto valor predictivo de la fertilidad de un varón, ya que el 85 % de los varones no cambiaron de categoría entre test con respecto al valor de corte del 30 %.

Sergerie y col (21), comprobaron cambios en el grado de fragmentación de ADN mediante TUNEL a lo largo de un período de 6 meses. Demostraron que la fragmentación de ADN es un parámetro con una buena repetibilidad sobre el tiempo tanto en pacientes infértiles como en varones fértiles. Aunque la diferencia respecto a nuestros resultados puede deberse a las diferentes técnicas empleadas, en su estudio no separaron las muestras en función del índice de fragmentación. No obstante, este grupo encontró que la variación entre sujetos era bastante más baja y con una tendencia menor en los donantes, comparada con los pacientes.

No conocemos las causas que pueden explicar la mayor variabilidad en varones con mayor IF encontrada en nuestro

estudio. La explicación más inmediata es que los orígenes de una alta fragmentación del ADN espermático aún no están claros y tienen diferentes principios biológicos. En nuestro estudio, los varones en tratamiento con cualquier tipo de medicación o suplemento alimenticio, así como fiebre o infección, fueron excluidos del estudio. Además, no se encontraron diferencias significativas en los días de abstinencia para la realización de la prueba. Ya que la etiología de la fragmentación de ADN en pacientes infértiles es probablemente multifactorial, son necesarios más estudios para conocer las razones de esta variabilidad.

## CONCLUSIÓN

Se podría establecer, que solo ante valores claramente alejados de la media y del punto de corte establecido como normalidad en el índice de fragmentación (generalmente aceptado en 30 %), se podrían extrapolar los resultados de una muestra a momentos alejados temporalmente de la muestra analizada. A la hora de establecer puntos de corte aplicables a la práctica clínica diaria es preciso tener en cuenta la importancia de la elevada variabilidad intraindividual en la fragmentación del ADN de diferentes muestras de su semen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, Sharma R, Humaidan P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*. 2021 Mar;53(2):e13874
2. Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C, Göker EN, Tavmergen E. Fluctuation of "sperm DNA integrity" in accordance with semen parameters, and it is relationship with infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Dec;31(12):1665-71
3. Rondanino C, Duchesne V, Escalier D, Jumeau F, Verhaeghe F, Peers MC, Mitchell V, Rives N. Evaluation of sperm nuclear integrity in patients with different percentages of decapitated sperm in ejaculates. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jul;31(1):89-99.
4. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2019 Jun;38(6):951-960.
5. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* (2007); 22:174-179.
6. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA (®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016 Jun; 169:56-75
7. Christman MS, Kraft KH, Tasian GE, Zderic SA, Kolon TF. Reproducibility and reliability of semen analysis in youths at risk for infertility. *J Urol*. 2013 Aug;190(2):683-8.
8. Jarow JP, Fang X, Hammad TA. L. Variability of semen parameters with time in placebo treated men. *J Urol*. 2013 May;189(5):1825-9.
9. Palacios ER, Clavero A, Gonzalvo MC, Rosales A, Mozas J, Mar-

- 
- tínez L, Ramírez JP, Björndahl L, Morancho-Zaragoza J, Fernández-Pardo E, Castilla JA. Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. *Hum Reprod.* 2012 Feb;27(2):314-22
10. Brooks A. and Keel H. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility* (2006) Vol. 85, No. 1, January
  11. Francavilla F, Barbonetti A, Necozone S, Santucci R, Cordeschi G, Macerola B, Francavilla S. Within-subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages. *Int J Androl.* 2007 Jun;30(3):174-81
  12. K. Oleszczuk A. Giwercman, and M. Bungum. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples. *Human Reprod* , 26 (2011).. 3244–3248.
  13. Evenson DP, Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Transl Androl Urol.* 2017 Sep;6(Suppl 4):S495-S500.
  14. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 2006a; 21:2061–2064
  15. Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008; 10:786–790.
  16. Castilla JA, Zamora S, Gonzalvo MC, Luna Del Castillo JD, Roland-Nofuentes JA, Clavero A, Björndahl L, Martínez L. Sperm chromatin structure assay and classical semen parameters: systematic review. *Reprod Biomed Online* 2010; 20:114–124
  17. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2010, ISBN: 978 92 4 154778 9.
  18. Fernández JL, Cajigal D, López-Fernández C, Gosálvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol.* 2011; 682:291-301
  19. Cruz I, Colmenares M, Berrueta-Carrillo L, Gomez-Perez R, Montes H, Berrueta L, Salmen S, Osuna JA. Evaluation of the quality of the human spermatozoon: comparison between spermatic DNA integrity and semen variables *Invest Clin.* 2010 Mar;51(1):87-99
  20. Ribeiro S, Sharma R, Gupta S, Cakar Z, De Geyter C, Agarwal. Inter- and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Andrology.* 2017 May;5(3):477-485
  21. Sergerie, M., Laforest, G., Boulanger, K., Bissonnette, F. & Bleau, G. Longitudinal study of sperm DNA fragmentation as measured by terminal uridine nick end-labelling assay. *Human Reproduction* (2005) 20, 1921–1927.
  22. Jerre E, Bungum M, Evenson D, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection *Fertil Steril.* 2019 Jul;112(1):46-53. e2.
  23. Smit M, Dohle GR, Hop WC, Wildhagen MF, Weber RF, Romijn JC. (2007) Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl.* (2007) Feb;30(1):48-55
-