

Influencia de la concentración de espermatozoides sobre los resultados de la ICSI

Influence of sperm count on ICSI results

Molina I^a, Cervera R.P^b, Dieguez L, Garcia-Reboll L, Romeu A^a

^aUnidad de Reproducción Humana. Hospital Universitario La Fe, Valencia.

^bLaboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia.

Resumen

Introducción: *Se ha propuesto la conveniencia de realizar rutinariamente análisis cromosómicos, tanto en espermatozoides como en embriones, cuando proceden de pacientes con factor varón severo (criptozoospermia), en base a una posible mayor incidencia de alteraciones cromosómicas cuando se presenta dicha condición que afectaría negativamente la tasa de fecundación, embarazo, aborto y a la obtención de nacidos vivos sanos.*

Objetivo: *Estudiar si la concentración de espermatozoides en fresco afecta a los resultados de la ICSI.*

Diseño: *Estudio retrospectivo de ciclos de ICSI entre enero de 2000 y mayo de 2003, en los casos en los que se transfirieron 2, 3 o 4 embriones, al menos 2 de ellos de grado 1-2. Se compararon las tasas de fecundación, implantación, embarazo, partos y abortos cuando la ICSI se realizó con espermatozoides de varones correspondientes a cuatro niveles de recuento en fresco: menor de 1 millón de spz/ml (grupo 1), entre 1 y 4 millones de spz/ml (grupo 2), entre 5 y 19 millones de espermatozoides (grupo 3) y mayor o igual a 20 millones (grupo 4).*

Ámbito: *Hospital Universitario de Referencia.*

Resultados: *La tasa de fecundación en el grupo 1 es menor que en el resto de grupos, aunque esta diferencia sólo alcanza niveles de significación frente al grupo 4 (grupo 1: 72% vs grupo 2: 80% vs grupo 3: 79% vs grupo 4: 87%). Las tasas de embarazo e implantación del grupo 1 no se vieron mermaidadas, llegando a ser incluso superiores significativamente a las del grupo 4 (embarazo: grupo 1: 43% vs grupo 4: 33%; implantación: grupo 1: 46% vs grupo 4: 31%; $p < 0.05$). Sin embargo, esta diferencia no se reflejó en diferencias entre grupos en las tasas de partos (rango: 71-76%) o de abortos (rango: 21-36%).*

Conclusiones: *Las bajas concentraciones de espermatozoides móviles, en sí mismas, no suponen una*

Correspondencia: I. Molina
Unidad de Reproducción Humana
Hospital Universitario "La Fe"
Avda. de Campanar, 21
46009 Valencia

mayor tasa de pérdidas que pudieran reflejar una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en los embriones finalmente transferidos. Ello se debería a que la ICSI permite la selección y microinyección de espermatozoides morfológicamente normales y preferiblemente móviles, en las que la probabilidad de presentar anomalías cromosómicas no estaría relacionada con la concentración.

Palabras clave: ICSI. Azoospermia. Criptozoospermia. Anomalías cromosómicas.

Summary

Introduction: *It has been proposed the suitability to carry out chromosome analysis in a routine way, on both spermatozoa and embryos derived from patients with severe male factor (cryozoospermia), since a possible higher chromosome abnormalities incidence would be present that would negatively affect fertility, pregnancy, abortion and live births rates.*

Objective: *To study the effects of sperm count on ICSI results.*

Design: *Retrospective study of ICSI cycles realized from January 2000 to May 2003 have been considered. A maximum of 4 embryos were transferred in each cycle, and at least 2 of those embryos transferred were of grades 1-2. Fertility, implantation, pregnancy, delivery and abortion rates were compared when spermatozoa derived from four different groups, regarding to sperm count in fresh samples: less than 1 million spz/ml (group 1), between 1 and 4 millions spz/ml (group 2), between 5 and 19 millions spz/ml (group 3) and more or equal to 20 millions spz/ml (group 4).*

Setting: *Human Reproduction Service at "La Fe" University Hospital.*

Results: *Group 1 showed a lower fertility rate than the rest of groups, although these differences only reached levels of significance when compared with group 4 (group 1: 72% vs group 2: 80% vs group 3: 79% vs group 4: 87%). Both pregnancy and implantation rates, in group 1, were not only reduced, but also were significantly higher than in group 4 (pregnancy: group 1: 43% vs group 4: 33%; implantation: group 1: 46% vs group 4: 31%; $p < 0.05$). However, no differences were observed among groups on both, delivery (range: 71-76%) and abortion rates (range: 21-36%).*

Conclusions: *The low sperm count does not determine a high embryo loss rate related to a possible higher presence of chromosome abnormalities on those embryos transferred. This fact could be explained since ICSI allows the selection and microinjection of normal morphology and motile spermatozoa, and therefore the probability to show chromosome abnormalities is not related to sperm count.*

Key words: ICSI. Azoospermia. Criptozoospermia. Chromosome abnormalities.

INTRODUCCIÓN

La ICSI ha permitido obviar, en gran medida, los problemas reproductivos de los varones estériles, incluso de aquellos pacientes con azoospermia. Existen numerosos trabajos que indican que los varones estériles, en general, presentan en sus espermatozoides una elevada frecuencia de anomalías cromosómicas (1-8), siendo ésta mayor en los varones que presentan criptozoospermia. Aunque también se han detectado daños en el DNA y alteraciones cromosómicas en varones estériles que presentan parámetros seminales normales (9). Sea cual sea el grado de normalidad, o no, de los parámetros seminales asociados a tales anomalías, éstas pueden determinar fallos de fecundación, retraso en la cronología de desarrollo embrio-

nario, muerte embrionaria temprana, abortos espontáneos y su transmisión a los fetos y a los nacidos vivos (10-24). Además, tras ICSI utilizando espermatozoides de varones estériles parece existir un mayor riesgo de generar anomalías cromosómicas de novo en la descendencia (11, 25, 26), superior al observado en la población general (27, 28, 11).

En base a todo ello, se ha propuesto la conveniencia de realizar análisis cromosómicos rutinarios, tanto en espermatozoides como en embriones, cuando procedan de varones estériles, y muy especialmente en los casos de criptozoospermia y azoospermia (25).

En el presente trabajo se pretende analizar si existe un efecto diferencial de una baja concentración de espermatozoides (criptozoospermia) sobre los resultados de la ICSI respecto al resto de varones estériles cuando se desconoce su condición cromosómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo (enero de 2000 y mayo de 2003) considerando aquellos casos de ICSI en los que la mujer presentaba una función reproductora normal o lesión tubárica no obstructiva (n=864 ciclos), siendo la causa de esterilidad estrictamente masculina. Los varones se agruparon en función de la concentración de espermatozoides en fresco en: menor de un millón de espermatozoides/ml (grupo 1), entre 1 y 4 millones de espermatozoides/ml (grupo 2), entre 5 y 19 millones de espermatozoides (grupo 3) y mayor o igual a 20 millones (grupo 4). Se excluyeron los casos en que se emplearon espermatozoides criopreservados obtenidos por biopsia testicular, aspiración epididimaria o semen eyaculado. De entre los casos que cumplían los requisitos anteriores, se seleccionaron aquellos en los que al menos 2 embriones presentaban 2-4 células y grado 1-2 el día 2 post-ICSI.

Protocolo de estimulación.

La hiperestimulación ovárica controlada se realizó con la administración a partir del tercer día del ciclo de estimulación de 150-450 UI diarias de FSH humana recombinante (Gonal Laboratorios Serono Madrid y/o Puregon, Laboratorios Organon Madrid) tras la supresión hipofisaria con análogos de la GnRH (Procrin, Synarel, Decapeptyl 0.1 diario) iniciada el día 22 del ciclo previo. La dosis diaria de FSH recombinante se ajustó en función de la respuesta individual de cada paciente.

Cuando se observó al menos 3 folículos de diámetro superior a 18 mm por ecografía vaginal y los niveles séricos de estradiol (evaluados por RIA; Bio Merieux España SA Madrid) fueron superiores a 600pg/ml, se desencadenó la ovulación con la administración de 10.000 UI de HCG (Profasi y/o Ovitrelle, Laboratorios Serono Madrid). La punción folicular se realizó 36 horas después de la administración de HCG por aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía.

Preparación de las muestras de semen.

Tras la licuefacción completa de las muestras de eyaculado durante 30-40 minutos a temperatura ambiente, se tomó una muestra y se evaluó el recuento y motilidad en fresco y capacitado, volumen, licuado, aglutinado, test inmunológico y la progresión.

El eyaculado se mezcló con medio de cultivo IVF

(Medicult) a partes iguales (volumen 1:1) y se realizó swim-up convencional. Los tubos (2-4), se centrifugaron a 300-600g durante 5-10 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 0,2-0,4 ml de IVF y se incubó durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂ en aire. Seguidamente se recuperó el sobrenadante en donde se encontraban los espermatozoides móviles, y se evaluó el recuento y la motilidad en capacitado. En los casos con recuento <0,5*10⁶ espermatozoides/ml y motilidad <1%++, los espermatozoides se concentraron por centrifugación del eyaculado con IVF a 1500-3000 g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 50-100 ul de IVF, y se evaluó la presencia de al menos un espermatozoide móvil en cámara Makler.

Fecundación y cultivo embrionario.

Los oocitos recuperados se lavaron en medio FM (Medicult). Seguidamente, las células del cúmulo se eliminaron con 80 UI/ml de solución de hialuronidasa (máximo 1 minuto), seguido por pipeteado mecánico. La ICSI se realizó siguiendo el procedimiento estándar entre 2 y 4 horas post-recuperación. Tras la ICSI los oocitos microinyectados se incubaron en medio IVF a 37°C y 5% CO₂ en aire.

El diagnóstico de la fecundación se realizó entre las 16-20 horas post-ICSI, en base al número de pronúcleos y/o corpúsculos polares. La transferencia se realizó 48 horas post-ICSI. Inmediatamente antes de la transferencia los embriones se clasificaron siguiendo el criterio de Veeck (29), en base al número y tamaño de las blastómeras así como la presencia de fragmentos citoplasmáticos. Se transfirieron un máximo de 4 embriones en función de su cronología de desarrollo y calidad embrionaria.

El diagnóstico de embarazo se realizó por determinación de BHCG sérica a los 12 días de la transferencia y, en caso de ser positiva, se confirmó mediante ecografía transvaginal 2 semanas después.

Análisis estadístico.

Se evaluó el efecto del recuento espermático en fresco sobre las tasas de fecundación, de gestación (número de gestaciones/número de transferencias controladas), de implantación (número de sacos a 7 semanas de gestación /número total de embriones transferidos en los casos con sacos detectados y controlados), de partos (número de partos con al menos un nacido/número de gestaciones controladas a término) y de abortos (número de no nacidos/número de sacos detectados en los casos con partos controlados).

Los resultados obtenidos se analizaron por análisis de varianza de una vía.

RESULTADOS

Los resultados se reflejan en la tabla correspondiente (Tabla 1).

En un 25% (30/119) de los casos del grupo 1 no se detectaron espermatozoides en la muestra en fresco o bien todos era inmóviles, pero tras su procesamiento se obtuvieron suficientes espermatozoides, en su mayoría móviles, para inyectar los oocitos.

La motilidad espermática aumenta significativamente a medida que la concentración en fresco es mayor (grupo-1: 2% vs grupo-2: 7% vs grupo-3: 8% vs grupo-4: 15%; $p < 0.05$). La tasa de fecundación en el grupo 1 es menor que en el resto de grupos, aunque esta diferencia sólo alcanza niveles de significación frente al grupo 4. Estas diferencias podrían ser debidas a la mayor dificultad técnica en la recuperación y microinyección de espermatozoides móviles en muestras sometidas a concentración por centrifugación. Por su parte, el número medio de células de los embriones transferidos es similar en todos los grupos (ver tabla 1).

La tasa de gestación del grupo 1 no se vio mermada, llegando incluso a ser significativamente superior

que en el grupo 4 (43% vs 33%, ver tabla). La misma tendencia se observa en las tasas de implantación (46% vs 31%, ver tabla). Es más, no se observaron diferencias significativas entre grupos en las tasas de partos (rango: 71-76%) o de abortos (rango: 21-36%).

Por su parte, de entre las pacientes que gestan, más de la mitad de los embriones transferidos no llegan siquiera a implantar, produciéndose además una pérdida adicional considerable de embriones implantados que no prosiguen el desarrollo a término. Tales pérdidas son más importantes en los grupos 1 y 2.

DISCUSIÓN

Algunos autores han intentado establecer una relación entre la presencia de anomalías cromosómicas que pudieran afectar el desarrollo embrionario y fetal y los parámetros seminales básicos (13, 19, 25).

En el presente trabajo, una posible explicación a la ligeramente inferior tasa de fecundación alcanzada cuando se utilizaron espermatozoides de varones del grupo 1, pudiera ser que parte de las muestras no presentaban espermatozoides en fresco o bien que los presentes eran inmóviles. Pese a que tras el procesamiento de estas muestras se recuperaron espermatozoides móviles, su localización resultó laboriosa y además es posible que su número fuese insuficiente y

Tabla 1

Resultados de tasa de fecundación, gestación, parto y aborto, así como de pérdidas fetales, en función de la concentración de espermatozoides en fresco

.	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total	Signif.
Nº casos	119	179	258	307	863	—
Tasa fecundación	(72%) ^b	(80%) ^{ab}	(79%) ^{ab}	(87%) ^a		P<0,05
Nº medio células	3,6	3,4	3,5	3,5		NS
Tasa gestación (1)	48/111 (43%) ^a	66/168(39%) ^{ab}	104/244(43%) ^a	97/297 (33%) ^b	315/820(38%)	P<0,10
Tasa partos (2)	19/25 (76%)	18/24 (75%)	47/66 (71%)	33/45 (73%)	117/160 (73%)	NS
Tasa abortos (2)	5/24 (21%)	7/26 (27%)	20/56 (36%)	12/46 (26%)	44/152 (29%)	NS
Nº sacos	58	81	138	81	358	—
Tasa implantación (3)	58/126 (46%) ^a	81/166 (49%) ^a	138/289(48%) ^a	81/265 (31%) ^b	358/846 (42%)	P<0,05
Tasa pérdida fetal (4)	32/58 (55%) ^{ab}	53/81 (65%) ^a	71/138(51%) ^b	33/81 (41%) ^b	189/358 (53%)	P<0,10

1 Evaluada sobre el número de casos de gestación controlada.

2 Evaluada sobre el número de casos con parto controlado.

3 Evaluada sobre el número de embriones transferidos en los casos de gestación positiva.

4 Evaluada como la diferencia entre el número de sacos y el de nacidos totales respecto al número de sacos, en aquellos casos de gestaciones controladas a término.

se microinyectarán espermatozoides inmóviles, afectando la tasa de fecundación, tal y como observaron Nagy y cols. (30). Este mismo grupo, en un trabajo posterior (31), observaron que incluso en los casos más extremos de infertilidad masculina (criptozoospermia, astenozoospermia total o teratozoospermia total) el único requisito imprescindible para el éxito de la ICSI es la disponibilidad de al menos un espermatozoide móvil para cada uno de los oocitos a microinyectar.

La ausencia de diferencias en las tasas de gestación, en la cronobiología embrionaria, en la capacidad de implantación, en las tasas de partos y de abortos, pudieran indicar que las bajas concentraciones de espermatozoides, en sí mismas, no suponen una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en los embriones finalmente transferidos.

Una posible explicación de los resultados aquí obtenidos pudiera ser que en ICSI, es el operador el que selecciona el espermatozoide que fecundará al oocito, y por tanto, este espermatozoide no necesariamente será representativo de toda la población espermática. De hecho algunos autores no han detectado ninguna relación entre los parámetros seminales básicos y las tasas de fecundación, implantación y gestación cuando la fecundación se realiza por ICSI (32, 33). Es más, incluso espermatozoides con daños en el DNA retienen capacidad suficiente para fecundar tras ICSI (34, 35). Oheninger y cols. (36), obtuvieron tasas de implantación y embarazo similares en varones normales y varones estériles criptozoospermicos.

Del presente estudio se concluye que la concentración de espermatozoides incluso en los casos de aparente azoospermia (ausencia de espermatozoides en fresco) no influyen en los resultados de la ICSI siempre y cuando se puedan microinyectar espermatozoides móviles.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Marin RH.:** Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridisation. *Fertil Steril* 1995; 64: 911-7.
2. **Martin RH.:** The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 924-5.
3. **Bernardini L, Martini E, Geraedts JP, Hopman AH, Lanteri S, Conte N, Capitanio GL.:** Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 431-8.
4. **Lähdeti J, Saari N, Ajosenpää-Saari M, Mykkänen J.:** Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolour fluorescence in-situ hybridisation. *Am J Med Genet* 1997; 71: 115-21.
5. **McInnes B, Rademaker A, Greene C, Ko E, Barclay L, Martin RH.:** Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 1998; 3: 2787-90.
6. **Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Simeon N, Joly G, Mace B.:** Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 1999; 105: 266-72.
7. **Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A.:** Screening for abnormalities of chromosomes X, Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm-injection program. *Fertil. Steril* 1999; 72: 696-701.
8. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizarro D.:** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-7.
9. **Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK.:** Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 313-8.
10. **Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S, Van Hemel JO, Van Den Ouweland AM, Brandenburg H, Pieters MH, Verhoeff A, Vermeer MC, Dhont M, In't Veld PA.:** Determination of the parent origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 682-6.
11. **Bonduelle M.:** Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 731: 781-2.
12. **Bartels I, Schlosser M, Bartz U, Pauer HU.:** Case report: paternal origin of trisomy 21 following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1998; 13: 3345-6.
13. **Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F.:** Chromosome 21 disomy in spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down Syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1067-72.
14. **Johnson MD.:** Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counselling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70: 397-411.
15. **Sakkas D, Mariethoz E, John JC.:** Abnormal sperm

parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350-5.

16. **Aitken RJ.**: The Amoroso lecture. The human spermatozoon- a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115: 1-7.
17. **Moosani N, Chernos J, Lowry RB, Martin RH, Rademaker A.**: A 47, XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24, XY spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14: 1137-8.
18. **Martínez-Passarell O, Nogues C, Bosch M, Egozcue J, Templado C.**: Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner Syndrome patients. *Hum Gen* 1999; 104: 345-9.
19. **Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J.**: Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 93-105.
20. **Givens CR.**: Intracytoplasmic sperm injection: what are the risks? *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: 58-65.
21. **Soares S, Templado C, Blanco J, Egozcue J, Vidal F.**: Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalized tendency to meiotic non-disjunction. *Hum Genet* 2001; 108: 134-9.
22. **Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Passarell O, Nogues C, Egozcue J, Templado C.**: Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 2001; 108: 499-503.
23. **Shi Q, Martin RH.**: Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121: 655-66.
24. **Venkataraman G, Craft I.**: Triple Y-syndrome following ICSI treatment in a couple with normal chromosomes: case report. *Hum Reprod* 2002; 17: 2560-3.
25. **Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.**: Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002; 17: 2600-14.
26. **Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I.**: Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 111-6.
27. **In't Veld PA, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F.**: Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection (letter). *Lancet* 1995; 346: 773.
28. **Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A.**: Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995; 346: 1095.
29. **VeecK LL.**: Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio de FIV. En Remohi, J.; Pellicer, A.; Bonilla-Musoles, F.; (Eds): *Avances en reproducción asistida*. Madrid Ediciones Diaz de Santos S.A.; 1992. Páginas 117-162.
30. **Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MP, Devroey P, Van Steirteghem AC.**: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10: 1123-9.
31. **Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC.**: Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 1): 143-54.
32. **Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM.**: The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 64: 982-6.
33. **Cohen J, Alikani M, Munne S, Palermo G.**: Micromanipulation in clinical management of fertility disorders. *Semin Reprod Endocrinol* 1994; 12: 151-6.
34. **Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ.**: Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 1864-71.
35. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS.**: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46.
36. **Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzerdorf S, Muasher S.**: Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/cytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 1998; 13: 2161-4.