



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO**

***“ALTERACIONES EN LA CALIDAD SEMINAL Y
FRAGMENTACIÓN DE ADN RELACIONADOS CON
LA EDAD EN PACIENTES INFÉRTILES ATENDIDOS
EN LA CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA
HISPAREP”.***

T E S I S

Que para obtener el Título de Subespecialista en
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

P R E S E N T A

FABIOLA GALLARDO GÓMEZ

**DR. CARLOS GERARDO SALAZAR LÓPEZ ORTIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN**

**M. en C PEDRO CUAPIO PADILLA
ASESOR DE TESIS**



HOSPITAL ESPAÑOL

Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi ejemplo de vida, enseñarme que con esfuerzo, dedicación y amor se pueden lograr las cosas y sobre todo apoyarme en este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor por ayudarme a desarrollar el trabajo presentado y profesores por sus enseñanzas durante estos 2 años.

INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

Dra. Fabiola Gallardo Gómez

Médico residente segundo año Biología de Reproducción Humana.

Hospital Español, HISPAREP.

Complejo Médico Antonio Fernández, Av. Ejército Nacional Mexicano 613-primer piso, Granada, Miguel Hidalgo, 11520. Ciudad de México.

Correo: fabiolagallardo3191@gmail.com

M. en C Pedro Cuapio Padilla

Andrólogo – Embriólogo.

Responsable del Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e investigación, HISPAREP.

Hospital Español, HISPAREP.

Complejo Médico Antonio Fernández, Av. Ejército Nacional Mexicano 613-primer piso, Granada, Miguel Hidalgo, 11520. Ciudad de México.

Correo: cuapiopp@yahoo.com.mx

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	2
INFORMACIÓN DE LOS AUTORES.....	2
1.0 INTRODUCCIÓN	5
1.1 Marco teórico.....	5
1.1a Sistema Reproductor masculino.....	5
1.1b Esteroidogénesis.....	6
1.1c Espermatogénesis.....	7
1.1 d Espermatozoide.....	8
1.1 e Regulación hormonal.....	8
1.1 f Infertilidad masculina.....	9
1.1 g Evaluación del varón infértil.....	10
1.1 h Análisis seminal.....	10
1.1 i Técnicas especializadas de evaluación seminal.....	11
1.1 j ADN.....	11
2.0 ANTECEDENTES.....	14
2.1 Mecanismos moleculares de fragmentación espermática.....	14
2.2 Factores de riesgo para fragmentación DNA espermático.....	15
2.3 Relación de la fragmentación espermática e infertilidad masculina.....	16
2.4 Implementación en la práctica clínica: Directrices de las sociedades profesionales y la sexta edición de la OMS.....	17
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
5.0 JUSTIFICACIÓN.....	18
6.0 OBJETIVOS.....	19
6.1 Objetivo General.....	19
6.2 Objetivos Específicos	20
7.0 HIPOTESIS	20
8.0 METODOLOGÍA	20
8.1 Diseño del estudio	21
8.1a Clasificación del Estudio:.....	21
8.1b Tipo de Investigación:	21
8.1c Características del Estudio:	21

8.1d Área de Investigación. Clínica	21
8.1e Línea de Investigación Reproducción asistida	21
8.2 Lugar donde se realizará el estudio.....	21
8.3 Universo, muestra y tamaño de la muestra	21
8.4 Método de Selección de los Participantes.....	21
8.5 Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes	22
8.6 Variables del Estudio	22
8.7 Procedimientos.....	23
8.8 Técnicas de Análisis Estadístico.....	24
9.0 RESULTADOS.....	24
10.0 DISCUSIÓN	29
11.0 CONCLUSIÓN	29
12.0 ASPECTOS ÉTICOS	29
13.0 BIBLIOGRAFÍA.....	30

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

1.1a Sistema Reproductor masculino.

El sistema reproductor masculino se divide anatómicamente en genitales internos y externos. Los genitales internos incluyen (testículos, cordones espermáticos, glándulas accesorias) mientras que los genitales externos incluyen (pene y escroto). La función correcta del sistema asegura la producción de suficientes gametos masculinos, su transporte exitoso y la secreción adecuada de hormonas sexuales masculinas¹.

Testículos.

Los testículos es un órgano ovalado de 3.7 a 5.1 cm de ancho y 3 a 5.2 cm de diámetro, formado por un sistema bicompartimental que consiste en túbulos seminíferos (90%) y un intersticio (10%). La pared tubular consiste en una membrana basal con células peritubulares contráctiles subyacentes, los túbulos están compuesto por el epitelio seminífero (células germinales y células de Sertoli) es el compartimiento generador de espermatozoides, el intersticio testicular contiene las células de Leydig (origen de la testosterona), fibroblastos, células inmunitarias y vasos sanguíneos. Las uniones intercelulares herméticas entre células de Sertoli crean una barrera de difusión que se denomina barrera hematotesticular la cual protege a las células germinales de antígenos, anticuerpos y toxinas ambientales¹.

Vías espermáticas.

El epidídimo comienza postero lateralmente al testículo, separado de este lateralmente por el seno del epidídimo, su conducto tiene una longitud de 3-4 metros, está rodeado por musculo lisos que producen contracciones rítmicas y está cubierto por la túnica vaginal. El epitelio ciliado de revestimiento absorbe el líquido testicular y ayuda a la transferencia y maduración de los espermatozoides (12 a 63 días).

Los conductos deferentes miden de 30 a 35 cm de largo y diámetro de 2 a 3 mm, tiene una pared muscular gruesa de 3 capas, transportan los espermatozoides a la uretra y sus células ejercen funciones como absorción o secreción. Inicia como una estructura tortuosa de 2 a 3 cm de longitud y luego sale de los vasos testiculares justo lateral a los vasos epigástricos inferiores, se une con el conducto de la vesícula seminal y terminar en el conducto eyaculador¹.

Glándulas sexuales anexas.

Existen tres glándulas accesorias que ayudan a enriquecer el líquido seminal con nutrientes y factores importantes en orden decreciente de contribución: vesículas seminales (13 ml de volumen promedio) forma parte del 50% del eyaculado rico en fructuosa, la próstata 20% del volumen eyaculado rico en azúcares y zinc y glándulas bulbouretrales y periuretrales (Cowper y Littre) secretoras de moco para lubricación¹.

Pene y uretra.

El pene tiene una raíz adherida al periné y un eje cubierto de piel colgante libre, está anclado a la sínfisis del pubis por dos ligamentos suspensorios. Internamente, el eje consta de tres cuerpos eréctiles esponjosos (dos cuerpos cavernosos dorsalmente y un cuerpo esponjoso ventralmente), la uretra del pene y las estructuras neurovasculares que lo acompañan y la fascia. En la raíz, los dos cuerpos cavernosos están anclados a las ramas isquiopúbicas, como los pilares del pene mientras que el cuerpo esponjoso forma el bulbo².

1.1b Esteroidogenesis.

Las dos hormonas gonadotrópicas hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) son los actores centrales en el eje hipotálamo hipófisis gonadal. Su liberación de las gonadotropinas pituitarias está controlada por hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El generador de pulsos GnRH en el hipotálamo se considera el interruptor de encendido/apagado del eje reproductivo. El generador de

pulsos GnRH controla todo el sistema reproductivo al afectar a ambas gonadotropinas. La regulación hormonal de GnRH controla dos bucles de retroalimentación regulatoria totalmente independientes que son responsables de la espermatogénesis (FSH-inhibina) o de la esteroideogénesis (LH-testosterona). La FSH actúa específicamente sobre las células de Sertoli que regulan la producción de espermatozoide del epitelio seminífero controlando la expansión de las células germinales pre meióticas. La inhibina B funciona como una señal endocrina para la integridad y la actividad del sistema de células madre, proporcionando una señal a la hipófisis sobre la capacidad de producción de esperma. La LH actúa sobre las células de Leydig estimulando la liberación de andrógenos que inducen o mantienen un fenotipo masculino, estimulan los órganos sexuales y las acciones controladas por andrógenos en la periferia. Al mismo tiempo, los andrógenos funcionan como hormona de retroalimentación a nivel hipotalámico. En este escenario, ambas gonadotropinas tienen funciones separadas y bucles de retroalimentación regulatoria independientes: el eje FSH y la inhibina que controla la producción de espermatozoides y el eje LH-testosterona la androgenización del organismo².

1.1c Espermatogénesis.

La espermatogénesis es un proceso estrictamente organizado que produce espermatozoides, el proceso consta de tres fases: mitótica o proliferativa, meiótica y espermiogénesis.

-Mitótica o proliferativa las espermatogonias reponen el conjunto de células madre o continua la diferenciación hacia la producción de espermatozoides maduros (tipo A y B).

-Meiótica los espermatozoides haploides, las espermatidas son el producto.

-Espermiogénesis tiene lugar la maduración de las espermatidas en espermatozoides seguida de la espermiación durante la cual los espermatozoides se liberan en los lúmenes de los túbulos seminíferos)

Todo este proceso tarda entre 60 a 70 días en completarse por lo que los efectos de agresiones externas se notan meses después del daño².

1.1 d Espermatozoide.

Los espermatozoides fueron descubiertos por Antonie van Leeuwenhoek en 1677³. Un espermatozoide maduro es una célula única altamente diferenciada que comprende las regiones de la cabeza, la parte media y la cola todo limitado por una sola membrana plasmática continua, la cabeza del esperma tiene entre 4,0 y 5,0 μm de longitud y de 2,0 a 3,0 μm de ancho, el acrosoma cubre entre el 40-60 % de su región anterior. La pieza central no tiene más de 1,5 veces la longitud de una cabeza típica y tiene aproximadamente 1 μm de grosor. La cola tiene de 45 a 50 μm de largo sin curvas ni torceduras afiladas. La morfología de los espermatozoides es un elemento clave del análisis clínico del semen⁴.

1.1 e Regulación hormonal.

Las variaciones en la frecuencia del pulso y la amplitud de la GnRH pueden modular la respuesta de las células gonadotrópicas permitiendo la liberación preferencial (**Diagrama 1**). Los dos ejes gonadotrópicos están completamente separados, lo que proporciona un control de retroalimentación independiente para la espermatogénesis (eje FSH-inhibina) y la esteroidogénesis (eje LH-testosterona) ya sea FSH o LH. El eje LH-testosterona funciona como un circuito de retroalimentación negativa. La LH actúa sobre las células de Leydig promoviendo la liberación de andrógenos después de la activación de varias cascadas de señalización intracelular. Los niveles séricos de andrógenos están controlados por la acción estimulante equilibrada de la LH en las células de Leydig frente a las acciones inhibitorias de los andrógenos en partes del cerebro que reducen la liberación de LH de los gonadotropas. En el varón, la testosterona es la hormona esteroide dominante que comunica a todos los órganos periféricos que la diferenciación sexual se ha dirigido hacia la diferenciación gonadal masculina⁵.

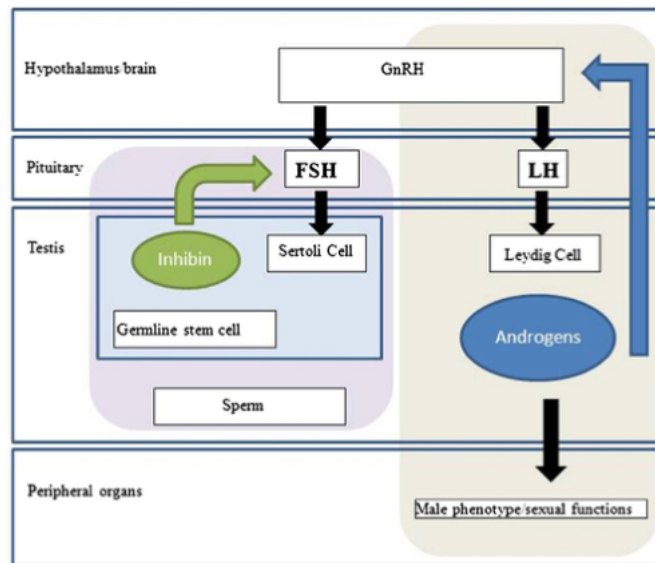


Diagrama 1 Control hormonal de la función testicular, retroalimentación independiente para espermaogénesis (FSH-inhibina) y esteroidogénesis (L-testosterona) ⁵

1.1 f Infertilidad masculina.

La postergación de la fertilidad es algo común en países desarrollados, se ha reportado desde 1980 que las tasas de natalidad han aumentado hasta un 40 % para los hombres de 35 a 49 años y han disminuido hasta un 20 % para los hombres menores de 30 años⁶; en México para el 2019 el INEGI reporta una reducción en la edad del primer hijo presentando un pico pasados los 30 años⁷, el factor masculino está implicado en el 50% de los casos de infertilidad y de estos un 30 al 40% son idiopáticos por lo que la edad y sus efectos en la calidad seminal juegan un papel importante en los tratamientos de reproducción asistida.

La edad paterna se ha asociado con parámetros seminales disminuidos, anomalías cromosómicas y disminución de la fertilidad asociado al daño en el ADN debido al aumento del estrés oxidativo del tracto reproductivo y apoptosis de las células germinales testiculares. El proceso anormal de condensación nuclear espermática implica una secuencia compleja de eventos que incluyen reordenamientos, transición de proteínas de unión al ADN, alteraciones transcripcionales, pérdida de la estructura nucleosómica y condensación anormal de la cromatina, lo que resulta

en alteraciones en la organización del material genómico en los núcleos espermáticos y disminución de la capacidad funcional de los espermatozoides disminuyendo la fertilización normal, afectando el desarrollo embrionario temprano e interfiriendo con la función principal del ADN espermático que es la transmisión de información genética paterna⁶.

Las células germinales pueden reaccionar activamente al daño del ADN de dos maneras: apoptosis o reparación del ADN. Se han descrito cinco mecanismos para la reparación del DNA espermático: reparación de escisión de nucleótidos (NER), reparación de escisión de base (BER), reparación de desajuste de ADN (MMR), reparación posterior a la replicación (PRR) y reparación de roturas de doble cadena (DSB). El mecanismo de reparación de roturas de doble cadena en los espermatozoides difiere de cualquier otra célula debido al grado de compactación de la cromatina de los espermatozoides maduros los cuales requieren proteínas de reparación de ADN específicas explicando la disminución de la capacidad de reparar el daño del ADN en las últimas etapas de la espermatogénesis, durante las cuales el daño genómico puede acumularse y transmitirse al embrión un ejemplo son los espermatozoides maduros los cuales son capaces de iniciar el proceso de reparación BER por la 8-oxoguanina DNA glicosilada¹ pero carecen de los componentes posteriores de esta vía, por lo que la reparación posterior del ADN es estrictamente dependiente de los ovocitos⁸.

1.1 g Evaluación del varón infértil.

La evaluación básica en infertilidad masculina es un historial médico completo, un examen físico y al menos 2 análisis de semen son la piedra angular de cualquier evaluación del hombre infértil. Estos proporcionan información que puede guiar el tratamiento y la evaluación posteriormente⁹.

1.1 h Análisis seminal.

El análisis seminal se basa en volumen de semen, concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides sin embargo no evalúa la función testicular y calidad del esperma por lo que las nuevas pruebas para predecir la posibilidad de

embarazo en técnicas de reproducción asistida son importantes por lo que se ha propuesto la fragmentación del ADN espermático como una prueba para valorar la capacidad reproductiva masculina¹⁰.

1.1 i Técnicas especializadas de evaluación seminal.

Los métodos de análisis de espermatozoides de laboratorio actuales son un indicador deficiente del resultado reproductivo, y durante muchos años ha sido claro que se requieren pruebas más nuevas y mejores. Aunque se han propuesto muchas pruebas de este tipo, solo se siguen considerando aquellas que determinan la calidad del ADN del espermatozoide. De estos, varias pruebas de fragmentación del ADN del espermatozoide están disponibles, aunque actualmente no hay consenso sobre la prueba más apropiada, la mejor muestra de prueba (espermatozoide fresco o lavado) o qué nivel de fragmentación es de interés clínico¹¹.

1.1 j ADN.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el modelo genético para la gran mayoría de las formas de vida en la tierra. Es una macromolécula compuesta de nucleótidos que llevan uno de los cuatro tipos diferentes de nucleobases, adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G); una desoxirribosa; y un grupo fosfato. El emparejamiento de bases determina las interacciones entre las bases de ADN, donde A se empareja con T y C se empareja con G a través del enlace de hidrógeno¹².

Los espermatozoides son diferentes de las células somáticas en la estructura de la cromatina, en el espermatozoide humano el 85% del ADN está compuesto por protaminas en una estructura laminar, mientras que el 15% restante en histonas¹³.

La integridad del genoma es primordial para mantener el equilibrio de la vida tanto en las células somáticas como en las germinales. Las células humanas dependen de un sistema de vigilancia intrínseco y altamente regulado que escanea minuciosamente el genoma en busca de problemas que podrían comprometer la integridad del ADN. Los insultos ambientales y endógenos al ADN surgen de fuentes como radicales libres de oxígeno, subproductos metabólicos reactivos y

otras reacciones bioquímicas en la célula. Si bien múltiples vías de reparación de ADN se esfuerzan por corregir el daño, a veces estos sistemas de reparación no pueden realizar su función lo que lleva a la acumulación de mutaciones o roturas de doble cadena de ADN que representan una amenaza ya que estas lesiones conducen a la muerte celular si no se reparan¹⁴. La importancia de la integridad del ADN espermatozoide es un factor importante que afecta a la competencia funcional del espermatozoide para cualquier método de reproducción asistida¹⁵.

Fragmentación de ADN.

La fragmentación del ADN es la característica principal de la apoptosis por lo que se utiliza como marcador. El ADN de doble cadena se divide por el factor de fragmentación del ADN (DFF). El factor de fragmentación es un heterodímero que consiste en una subunidad catalítica de 40 kDa (DFF40) y una subunidad reguladora de 45 kDa (DFF45). DFF 40 tiene actividad de endonucleasa a pH neutro en presencia de Mg^{2+} y corta específicamente el ADN de doble cadena con preferencia por la región rica en adenina -timina¹⁶.

Técnicas de estudio de la fragmentación de ADN.

Hay ocho pruebas diferentes de fragmentación del ADN de los espermatozoides disponibles para uso clínico, estas pruebas se dividen en dos categorías principales: aquellas que miden directamente las partes rotas del ADN del espermatozoide mediante la fijación de una sonda o etiqueta a la parte dañada o mediante la visualización de la dispersión del ADN:

-Ensayo de etiquetado de extremo de muesca (TUNEL) cuantifica la incorporación enzimática de desoxinucleotidil transferasa terminal desoxiuridina trifosfato (dUTP) en las roturas de ADN. Se puede hacer usando microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo la ventaja es que es un método sensible, fiable con una mínima variabilidad entre observadores.

-Ensayo de dispersión de cromatina espermática (SCD) o Halo evalúa la dispersión de los fragmentos de ADN después de la desnaturalización, utiliza microscopía óptica y fluorescencia.

-Ensayo de cometa evaluación electroforetica de fragmentos de ADN lisado, utiliza microscopia de fluorescencia.

-Ensayo de cometas y ensayo de estructura de cromatina esperática (SCSA) mide la suceptibilidad del ADN espermatozoide a la desnaturalización. La prueba es la versión citometrica de flujo de la prueba AO, utiliza citometria de flujo

-Prueba de naranja acridina (AO) evalúa el cambio metacromatico en la fluorescencia de AO cuando se une al ADN de una sola cadena (SS) ,utiliza microscopia de fluorescencia.

-Manchas de cromomicina (CMA3) se evalúa la unión competitivamente al ADN visualizando indirectamente el ADN con una deficiencia de protamina, utiliza microscopia de fluorescencia.

-Tinción de toluidina (TB) mide el aumento de la afinidad de la toluidina con los residuos de fosfato de ADN de los espermatozoides, utiliza microscopia óptica.

-Azul de anilina (AB) evalúa el aumento de la afinidad del tinte AB para perder la cromatina del núcleo en el espermatozoide utilizando microscopia optica¹⁷.

No está claro si se deben realizar mediciones en el esperma en el semen no procesado (es decir, representativo de la salida del testículo y los sitios de almacenamiento post-epiddídica) o en el espermatozoide después de la centrifugación del gradiente de densidad (es decir, representativo de aquellos que podrían usarse en la reproducción asistida)¹⁸.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos moleculares de fragmentación espermática.

La replicación activa de las células germinales en la primera fase de la espermatogénesis puede dar lugar a errores de transcripción que podrían dañar la integridad del genoma heredado del organismo. Se sabe que las roturas de doble cadena (DSB) se inducen fisiológicamente en los espermaticitos durante la profase I de la meiosis para permitir la recombinación del ADN entre cromosomas homólogos¹⁹, estas alteraciones durante la meiosis pueden ser potencialmente peligrosas ya que pueden causar fragmentación cromosómica, pérdida de dominios cromosómicos, translocaciones y otras anomalías genéticas²⁰. Los medicamentos gonadotóxicos y la radiación ionizante, pueden conducir directamente a la rotura de la hebra de ADN incluidas las DSB.

Durante las últimas fases de la espermatogénesis es decir la espermiogénesis, la cromatina espermática sufre condensación del ADN, donde casi todas las histonas originales son reemplazadas por protaminas, lo que garantiza un alto nivel de compacidad en el núcleo espermático²¹. La condensación defectuosa de la cromatina durante la espermatogénesis, que resulta en una protaminación inapropiada y un empaquetado insuficiente de la cromatina, podría generar daño en el ADN del esperma²².

Las roturas de una sola cadena (SSB) son causados por la actividad de la ligasa de ADN adyacente a la lesión o por la topoisomerasa. La topoisomerasa es una enzima que se dobla o desenrolla las cadenas de ADN. Durante el proceso de compactación de la cromatina en la espermiogénesis, la topoisomerasa II facilita la creación de roturas en el ADN para reducir el estrés torsional para el desmontaje de histonas y el envasado de cromatina. Si estas roturas no se modifican, el consiguiente deterioro del empaque de cromatina resulta en un aumento de fragmentación espermática del ADN. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales libres y el peróxido de hidrógeno se consideran una de las principales causas de las roturas de una sola cadena causando modificaciones de la

base del ADN que conducen a la formación de 8-hidroxi-2'-desoxinosina (8-OHdG) y peroxidación lipídica. La estructura del ADN se desestabiliza por esos aductos de base oxidada, lo que resulta en roturas del ADN⁸.

2.2 Factores de riesgo para fragmentación DNA espermático.

El espermatozoide se produce en los túbulos seminíferos y luego se almacena en el epidídimo para su posterior liberación, para que madure debe pasar a través del epidídimo donde sufre una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos el tiempo de tránsito epididimal es entre 2 y 11 días. La variación está influenciada por la frecuencia eyaculatoria, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un período de abstinencia de 2 a 7 días antes de la obtención de muestra para la evaluación estándar del semen, sin embargo estudios recientes han sugerido que la abstinencia más corta es mejor para las técnicas de reproducción asistida (TAR) ya que el aumento de abstinencia disminuye la vitalidad de los espermatozoides, la motilidad progresiva, positividad de CMA3 y aumento en la fragmentación de DNA por lo que el período de abstinencia es importante para garantizar tanto la cantidad como la calidad de los espermatozoides²³.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio en la homeostasis entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante total en el semen, también puede originarse en fuentes exógenas como los tóxicos, el tabaquismo, el alcohol, la dieta y la radiación o fuentes endógenas como el varicocele, aumento de la temperatura escrotal, envejecimiento atribuyéndose a la exposición acumulada de especies reactivas de oxígeno y a la apoptosis desordenada así como a una disminución de la capacidad antioxidante y a un mayor número acumulado de ciclos espermatogénicos en un contexto en el que las actividades de reparación del ADN pueden disminuir y se pueden adquirir más mutaciones. Las infecciones genitourinarias y la inflamación del tracto genital masculino también pueden aumentar la producción de ROS a través de la activación de los glóbulos blancos. Finalmente, la exposición a ROS durante la transferencia de espermatozoides del testículo al epidídimo después de la espermatogénesis también puede conducir a (SDF) fragmentación DNA espermático por lo que se

intuye que una abstinencia más larga podría aumentar las SDF ya que el ADN de los espermatozoides puede ser dañado mientras que los espermatozoides se almacenan.

2.3 Relación de la fragmentación espermática e infertilidad masculina

Los factores femeninos son importantes para determinar el éxito de la fertilización in vitro (FIV). Sin embargo, muchos informes han demostrado que los factores masculinos también afectan el éxito o el fracaso de la FIV lo que indica que el examen masculino es importante para evaluar la fertilidad en las parejas.

La espermatobioscopia directa o análisis seminal es un estudio para evaluar la calidad del espermatozoide y diagnosticar infertilidad masculina proporcionando datos indirectos sobre la producción de espermatozoides por testículos, espermiogénesis o maduración del espermatozoide, sin embargo no puede predecir el nivel de fertilidad. Durante las últimas décadas se ha estudiado la integridad del ADN nuclear espermático para evaluar calidad espermática y posible asociación con potencial fertilizante, desarrollo embrionario y resultados reproductivos^{24,25}

El impacto de la edad en la integridad del ADN espermático fue descrito por *Kaarouch et al 2018* demostrando que los hombres mayores a 40 años tenían un porcentaje mayor de DFI que los hombres más jóvenes²⁶. *Vagnini et al 2007* observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con el ADN espermático fragmentado en pacientes menores de 35 años comparado con 36-39 años y mayores a 40 años²⁷.

Winkle et al 2009 concluyeron que en hombres mayores de 40 años los valores seminales alterados estaban relacionados con un porcentaje mayor de DFI comparado con los hombres de 36 a 39 años ²⁸ *Rosiak et al 2019* demostró una asociación entre la edad paterna avanzada y la integridad de la cromatina espermática en el grupo mayor a 40 años independientemente de los valores de la espermatobioscopia demostrado que la evaluación de la calidad del ADN espermático nuclear tiene mayor utilidad clínica que el análisis de semen estándar y

discrimina mejor a los hombres con un potencial de fertilidad normal de los hombres con un potencial de fertilidad reducido^{29,30}.

La causa más común de fragmentación del ADN del espermatozoide es la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales hidroxilo, anión superóxido, peróxido de hidrogeno y estrés oxidativo, se requieren bajos niveles de ROS para la capacitación de espermatozoides, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión espermatozoide- ovocito por lo que la alta concentración de ROS es dañina y altera los parámetros del semen produciendo mutaciones y polimorfismos puntuales lo que resulta en disminución en la calidad seminal³¹.

Le et al. Informaron en su estudio que aproximadamente el 8 % de los hombres infértiles tienen altos valores de índice de fragmentación espermática (DFI) (≥ 30 %). Un DFI alto a menudo resulta en un bajo rendimiento de la FIV. Aunque no hubo una diferencia significativa en la tasa de fertilización normal de ICSI, la tasa de desarrollo de blastocitos fue significativamente más baja en el grupo de DFI alto, esto es porque el genoma embrionario se activa en la etapa de 4 células y la influencia de los genes parentales se refleja en la etapa de 8 células. Por lo tanto, la mayoría de los investigadores creen que el daño en el ADN del esperma no afecta la fertilización del ovocito o el desarrollo embrionario antes de la etapa de 4 células³². *Agrawal et al. 2019* también informaron que los factores asociados con el daño del ADN espermático se ven afectados por lípidos espermáticos anormales, hormonas reproductivas y mitocondrias³³, estos factores están involucrados en el estrés oxidativo y la apoptosis debido a la disminución de la fecundidad masculina dependiente de la edad.

2.4 Implementación en la práctica clínica: Directrices de las sociedades profesionales y la sexta edición de la OMS

Actualmente, las directrices de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) no recomiendan la prueba de rutina de fragmentación DNA espermática en la evaluación de la infertilidad masculina debido a la falta de información³⁴. Por otro lado, las directrices de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) establecen que las pruebas de SDF podrían considerarse con

finés explicativos en parejas con pérdida gestacional recurrente³⁵. Del mismo modo, las directrices de la Asociación Europea de Urología (EAU) en 2020 también recomiendan la prueba fragmentación en parejas con pérdida gestacional recurrente después de un embarazo natural y parejas masculinas con infertilidad inexplicable³⁶.

La sexta edición del manual del laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen reconoce que existen limitaciones para evaluar la funcionalidad de los espermatozoides con una espermatobioscopia por lo que retoma la importancia de realizar las pruebas de función de los espermatozoides introduciendo la fragmentación del DNA espermático como un examen extendido convirtiéndose en uno de los biomarcadores más discutidos y prometedores en andrología³⁷.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los criterios de evaluación de espermatozoides basados únicamente en métodos convencionales de análisis de semen pueden no ser un estudio principal para determinar el potencial de fertilidad en un paciente. Actualmente se ha propuesto la evaluación de la fragmentación ADN espermático como una prueba extendida que puede ayudarnos a evaluar la capacidad reproductiva del espermatozoide.

4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las alteraciones en el análisis seminal relacionados con la edad y la fragmentación espermática en pacientes infértiles?

5.0 JUSTIFICACIÓN

Generalmente la fertilidad masculina se evalúa mediante análisis de semen por espermatobioscopia directa el cual depende de la subjetividad del observador por lo que la sensibilidad diagnóstica del análisis de la motilidad del semen para evaluar el potencial de fertilidad es baja así como los datos de alteraciones morfológicas

también es subjetiva ya que se basa únicamente en una evaluación aproximada de los espermatozoides vistos a través de un microscopio. Existe evidencia que el DFI aumenta con la edad en los hombres. Le et al. 2019 informó en su estudio que aproximadamente el 8% de los hombres infértiles tienen valores altos de DFI ($\geq 30\%$)³⁸.

Los modelos de FIV e ICSI que utilizan ovocitos de donantes con fertilidad demostrada también se han utilizado para estudiar el impacto de la fragmentación del espermatozoide en la fertilidad comprobando su implicación en los resultados reproductivos, Gosálvez et al 2013 realizó un estudio de ICSI que utilizó ovocitos de donantes de fertilidad probada demostrando que las tasas de fragmentación de espermatozoides de parejas no embarazadas (34,9 %) eran más altas que las de las parejas embarazadas (25,3 %; $p < 0,001$) concluyendo que un valor umbral de fragmentación espermática del 24,8 % tiene una sensibilidad del 75 % y una especificidad del 69 % para la predicción del embarazo. Una DFI alta da como resultado un mal desenlace reproductivo en paciente en algún tratamiento de reproducción afectando el desarrollo de blastocistos³⁹. Es por esto que decidimos analizar retrospectivamente la relación de la edad con el resultado de la espermatozoidoscopia y el índice de fragmentación espermática y poder comprobar como el factor edad es importante en la calidad seminal presentando parámetros alterados y mayor fragmentación del ADN en el espermatozoide y poder observar la importancia de estos dos estudios como parte del abordaje de infertilidad masculina para poder ofrecer un tratamiento individualizado que mejore los resultados en los tratamientos de alta complejidad.

6.0 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar las alteraciones en la calidad seminal y fragmentación de ADN relacionados con la edad en pacientes infértiles.

6.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la calidad seminal de pacientes infértiles.
- Determinar el porcentaje de DFI y su relación con los diferentes diagnósticos por análisis seminal.
- Verificar si existe correlación entre la edad con la calidad seminal y el DFI en pacientes infértiles.

7.0 HIPOTESIS

Por el carácter descriptivo del protocolo no se necesita hipótesis.

8.0 METODOLOGÍA

Estudio observacional, transversal, retrolectivo Se realizó una recolección de datos en el expediente clínico del laboratorio de andrología de la clínica de reproducción asistida HISPAREP en el Hospital Español de México de enero del 2018 a diciembre del 2022.

8.1 Diseño del estudio

8.1a Clasificación del Estudio: Cuantitativo

8.1b Tipo de Investigación: Observacional, transversal, retrolectivo

8.1c Características del Estudio:

8.1d Área de Investigación. Clínica

8.1e Línea de Investigación Reproducción asistida

8.2 Lugar donde se realizará el estudio

Laboratorio de Andrología de la Clínica Hisparep Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español.

8.3 Universo, muestra y tamaño de la muestra

Universo. A conveniencia de todos los hombres que acudieron a Hisparep para un tratamiento de reproducción asistida y se les realizó un estudio seminal y fragmentación espermática. Tamaño de la muestra de pacientes con diagnóstico de infertilidad.

8.4 Método de Selección de los Participantes

Muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

Pacientes masculinos que serán incluidos dentro del protocolo que hayan acudido a la Clínica de reproducción asistida Hisparep para un tratamiento de reproducción asistida, ya sea con infertilidad primaria o secundaria.

8.5 Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes

a. Criterios de Inclusión

- Pacientes con infertilidad primaria o secundaria
- Masculinos con espermatobioscopia y fragmentación DNA espermático

b. Criterios de Exclusión

- Pacientes con azoospermia
- Expedientes o datos incompletos

8.6 Variables del Estudio

Variables	Indicadores	Definición operacional	Definición universal	Tipo de variable
Edad	Expediente	años	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Numérica Continua
Etiología	Laboratorio	Normozoospermia Teratozoospermia Oligoastenoteratonecrozoospermia	Alteraciones en la movilidad, morfología, volumen.	Categórica Nominal

		Astenoteratonec ozoospermia Astenoteratozoo spermia Oligoastenoterat ozoospermia Oligoteratozoo spermia Oligoteratonecro zoospermia Otras etiologías		
Índice de fragmentación DFI	Laboratorio	Integridad de material genético de una muestra de semen	Analiza las roturas o lesiones en las cadenas de ADN espermático	Numérica Continua
Índice de teratozoospermia	Laboratorio	Porcentaje de alteraciones morfológicas	Número de zonas afectadas en cada espermatozoide anómalo.	Numérica Continua
Espermas vacuolados	Laboratorio	Número de vacuolas	Detecta algún defecto o anomalía en el proceso de espermatogénesis o maduración espermática	Numérica Discreta
Residuos citoplasmáticos	Laboratorio	Número de residuos citoplasmáticos	Presencia de gran cantidad de citoplasma teñido e irregular	Numérica discreta

8.7 Procedimientos

Se revisarán los expedientes de todos los pacientes masculinos que hayan acudido a la clínica Hisparep en el periodo de enero 2018 a diciembre 2022 y se seleccionarán aquellos expedientes que cumplan con los criterios de inclusión. Posteriormente se recolectarán los datos de los expedientes en una hoja de recolección de datos para después transcribirse a una base de datos en un documento de Excel y finalmente realizar el análisis estadístico.

8.8 Técnicas de Análisis Estadístico

Se realizará un análisis con estadística descriptiva e inferencial. Para el análisis descriptivo se utilizarán frecuencias y proporciones para las variables categóricas y medidas de tendencia central y de dispersión para las variables numéricas. Dependiendo de la normalidad y homocedasticidad se utilizarán pruebas paramétricas o no paramétricas.

9.0 RESULTADOS

Se realizó un estudio retrospectivo en pacientes con diagnóstico de infertilidad entre 2018 a 2022. Se incluyeron un total 206 pacientes masculinos infértiles a los cuales se les realizó una espermatobioscopia y prueba de fragmentación espermática para evaluar la información sobre el diagnóstico y tratamiento de infertilidad en la clínica de HISPAREP.

Las muestras se recolectaron después de 3 a 5 días de abstinencia sexual, se obtenían los eyaculados por masturbación en recipiente estériles. Se analizaron entre los 30 a 60 minutos a 36°C, posteriormente se realizó el análisis de semen de acuerdo con los criterios del manual de laboratorio de la OMS 2020. Se determinó la concentración, movilidad, vitalidad y morfología con los criterios estrictos de Kruger. Una vez realizado el análisis se tomó una alícuota de 200 µl para la determinación de la Fragmentación de ADN espermático. Para ello se toman 25 µl de la muestra y se colocaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión. La agarosa se colocó en un portaobjetos tratado y se colocó un cubreobjetos para formar una capa sólida la cual fue fijada a temperatura fría. Posteriormente se retiró el cubreobjetos y el portaobjetos fue colocado en solución desnaturalizante, posteriormente solución lisis, se lavó en agua destilada, se deshidrató en alcoholes al 75 y 90% respectivamente; se dejó secar y se procedió a realizar la tinción (tinción Dif quick). Se evaluaron los halos de acuerdo al inserto del Kit Halosperm (Halosperm, España). Se leyó la laminilla con microscopio de fases, objetivo de inmersión (100X). Se contaron 500 espermatozoides por duplicado. El resultado se

expresó en % y se determinó el potencial fertilizante (DFI) con los valores de referencia.

En la **(tabla 1)** se muestran las características generales de los pacientes, los resultados de la población mostraron una mediana de edad 39.8 ± 6.6 , volumen seminal 2.5 ± 1.1 ml, concentración 49.4 ± 27.8 mill/ml, vitalidad 74.7 ± 14.8 %, motilidad progresiva 45.3 ± 17.1 %, morfologías normales 2.2 ± 1.1 %, DFI 27.9 ± 9.3 %.

Tabla 1. Datos generales N: 206

	Edad	Abstinencia	Volumen	Vitalidad	Concentracion	Progresivos	No progresivos	Inmoviles	TMP	Normales	Anormales	Cabeza	Pieza media	Cola	Residuo citoplasmatico	Indice de Teratozoospermia	Indice de deformidad	No fragmentados	Fragmentados	DFI
Media	39.8	4.6	2.5	74.7	49.4	45.3	12.0	42.9	63.2	2.2	97.7	90.5	85.3	17.3	14.7	2.0	1.9	359.1	140.8	27.9
Desv Stand	6.6	5.8	1.1	14.8	27.8	17.1	3.5	16.6	57.9	1.1	1.2	6.3	10.9	10.9	10.4	0.2	0.2	49.4	49.5	9.3
Error Stand	1.0	2.7	0.7	1.7	4.0	2.5	1.0	2.5	7.3	0.7	0.1	0.7	1.2	2.6	2.7	0.1	0.1	2.6	4.2	1.8

Los pacientes se dividieron por 4 rangos de edad (**Tabla 2**) : < de 30 años, 31 a 35 años, 36 a 40 años y > a 41 años, Se observó que < de 30 años el DFI 26.1 ± 5.8 %, 31 a 35 años DFI 26.9 ± 12.9 %, 36 a 40 años DFI 27.5 ± 9.4 %, > a 41 años DFI 27.9 ± 7.4 %. Se realizó una correlación del diagnóstico por espermatooscopia y el nivel de DFI observando el aumento de la presencia de espermatozoides vacuolados, espermatozoides con residuos citoplasmáticos e índice de teratozoospermia con respecto a los 4 rangos de edad (**Tabla 3**).

Tabla 2. Relación de etiologías análisis seminal y DFI por

Etiologías	< 30 años		31-35 años		36-40 años		> 41 años	
	No	DFI	No	DFI	No	DFI	No	DFI
Normozoospermia	4	23.4	10	22.1	8	23.8	2	25.7
Teratozoospermia	5	26.0	18	22.9	48	25.1	59	26.9
Oligoastenoteratonecrozoospermia	1	37.2	2	72.0	2	27.3	1	30.4
Astenoteratonecrozoospermia	-	-	1	26	2	34.9	2	43.5
Astenoteratozoospermia	-	-	4	29.5	4	25.3	7	30.9
Oligoastenoteratozoospermia	-	-	1	37.1	5	33.7	5	42.2
Oligoteratozoospermia	-	-	2	32.0	4	27.4	3	40.4
Oligoteratonecrozoospermia	-	-	-	-	2	55.1	-	-
Otras etiologías	-	-	-	-	2	53.8	2	24.2
Total	10 (100)	26.1	38 (100)	26.9	77(100)	27.5	81(100)	29

Total	No (%)	DFI
	206(100)	27.9

Tabla 3. Relación de etiologías análisis seminal y DFI por grupo de edad.

Etiologías	< 30 años				31-35 años				36-40 años				> 41 años			
	DFI	Esperm Vac	Esper Res Cit	Indice de teratozoospermia	DFI	Esperm Vac	Esper Res Cit	Indice de teratozoospermia	DFI	Esperm Vac	Esper Res Cit	Indice de teratozoospermia	DFI	Esperm Vac	Esper Res Cit	Indice de teratozoospermia
Normozoospermia	23.4	1.5	11.5	1.9	22.1	0.8	9.9	1.9	23.8	1.1	18.4	1.9	25.7	1.5	10.5	1.7
Teratozoospermia	26.0	2.0	13.6	2.0	22.9	1.4	9.9	1.9	25.1	1.3	13.7	2.0	26.9	1.6	15.7	2.0
Oligoastenoteratonecrozoospermia	37.2	3	37	2.2	72	3.0	18.0	2.0	27.3	0.5	23.5	1.9	30.4	1	24	2.3
Astenoteratonecrozoospermia	-	-	-	-	26	1	11	1.8	34.9	1.0	19.5	2.1	43.5	1.0	10.5	2.0
Astenoteratozoospermia	-	-	-	-	29.5	0.8	17	2.0	25.3	1.8	18.0	2.0	30.9	1.4	11.6	2.0
Oligoastenoteratozoospermia	-	-	-	-	37.1	1	7	2.0	33.7	1.8	14.6	2.0	42.2	1.8	15.6	2.1
Oligoteratozoospermia	-	-	-	-	32.0	2.0	8.5	2.1	27.4	0.8	17.0	2.0	40.4	1.7	33.7	2.1
Oligoteratonecrozoospermia	-	-	-	-	-	-	-	-	55.1	1.5	30	2.2	-	-	-	-
Otras etiologías	-	-	-	-	-	-	-	-	53.8	2.5	16.5	2.2	24.2	2.5	9.5	2.1
Total	26.1	1.9	15.1	2.0	26.9	1.3	11.0	1.9	27.5	1.3	15.5	2.0	29.0	1.6	15.7	2.0

La presencia de un DFI alto está acompañada de un deterioro significativo de la morfología de los espermatozoides que va aumentando conforme la edad avanza siendo más evidente a partir de los 36 años, < 30 años morfología normal 2.6 ± 1.3 , 31 a 35 años 2.7 ± 1.3 , 36 a 40 años 2.3 ± 1.1 , > 41 años 2.0 ± 0.9 (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros seminales por grupo de edad y DFI.

4Etiologías	< 30 años						31-35 años						36-40 años						> 41 años						
	DFI	Vitalidad	Concentración	Progresivos	Morfología normal	DFI	Vitalidad	Concentración	Progresivos	Morfología	DFI	Vitalidad	Concentración	Progresivos	Morfología normal	DFI	Vitalidad	Concentración	Progresivos	Morfología normal	DFI	Vitalidad	Concentración	Progresivos	Morfología normal
Normozoospermia	23.4	81.8	40.0	51.0	4.0	22.1	80.6	61	54.8	4.3	23.8	80.4	62.9	49.9	4.5	25.7	82	65.5	56.5	4.0	25.7	82	65.5	56.5	4.0
Teratozoospermia	26.0	81.2	42.4	48.2	1.8	22.9	81.3	55.6	50.4	2.3	25.1	80.8	63.4	54.6	2.2	26.9	77.3	58.5	47.7	2.1	26.9	77.3	58.5	47.7	2.1
Oligoastenoteratozoospermia	37.2	9	6	0	1.0	72	29.0	5.5	16.0	1.0	27.3	52	6.5	25	1.5	30.4	43	5	17	1	30.4	43	5	17	1
Astenoteratozoospermia	-	-	-	-	-	26	28	53	18	3	34.9	35.5	22	15.5	2.5	43.5	39	17.5	16.5	1.5	43.5	39	17.5	16.5	1.5
Astenoteratozoospermia	-	-	-	-	-	29.5	73.3	32.3	28.3	1.8	25.3	74	27.8	25.8	2.3	30.9	65.1	41.7	26.4	2.3	30.9	65.1	41.7	26.4	2.3
Oligoastenoteratozoospermia	-	-	-	-	-	37.1	63	11	30	2	33.7	64	7.4	29.8	1.2	42.2	62.4	6.8	20.0	0.8	42.2	62.4	6.8	20.0	0.8
Oligoteratozoospermia	-	-	-	-	-	32.0	71	6	57	1.5	27.4	76	11.3	40	1.5	40.4	82	4.3	64.7	0.7	40.4	82	4.3	64.7	0.7
Oligoteratozoospermia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.1	41	14	28	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otras etiologías	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53.8	64.5	5.2	18	0.5	24.2	55	83	31.5	1.5	24.2	55	83	31.5	1.5
Total	26.1	74.2	37.8	44.5	2.6	26.9	75.1	48.1	46.4	2.7	27.5	75.7	49.8	46.8	2.3	29.0	73.7	50.9	43.5	2.0	29.0	73.7	50.9	43.5	2.0

10.0 DISCUSIÓN

Nuestra población de estudio tiene una edad media de 39.8 ± 6.6 con un DFI $27.9\% \pm 7.4$ lo cual nos hace ver que la postergación de la fertilidad en México concuerda con lo reportado en el INEGI, se pudo observar que a partir de los 36 años hay un aumento en el DFI siendo más marcado a partir de los 41 años lo cual coincide con los datos reportados por *Donald P et al 2020* , los pacientes normozoospermicos presentaron niveles más bajos en DFI en comparación con todos los grupos que presentaban alguna alteración en el diagnóstico de espermatobioscopia por lo que la presencia de alteraciones en el análisis seminal aumentan con la edad siendo la más evidente la disminución de formas normales de espermatozoides lo cual se ve reflejado en el DFI .

11.0 CONCLUSIÓN

En la población que estudiamos observamos como el factor edad es importante en la calidad seminal presentando parámetros alterados y mayor fragmentación del ADN en el espermatozoide, evaluar mediante análisis seminal por espermatobioscopia y fragmentación de ADN en pacientes con diagnóstico de infertilidad masculina nos permite ser objetivos para el tratamiento que se les puede ofrecer para mejorar los resultados en los tratamientos de alta complejidad.

12.0 ASPECTOS ÉTICOS

10.1 Clasificación de la Investigación: Investigación sin riesgo

10.2 Riesgos Previsibles y Probables

Sin riesgo

10.3 Medidas de Protección Frente al Riesgo Físico y/o Emocional

No Aplica

10.4 Carta de Consentimiento Informado

Aviso de Privacidad Hisparep

10.5 Archivo Confidencial de la Investigación

Nuestra base de datos será resguardada en una computadora protegida con contraseña. Sólo tendrán acceso a los datos los investigadores del estudio. Así mismo, asumo la responsabilidad de salvaguardar los datos personales de las pacientes que se incluyan en este estudio.

Los autores declaran no tener conflicto de interés en el estudio.

13.0 BIBLIOGRAFÍA

1.-Ahmed Sayed Mettawi. Anatomy and embryology of male and female reproductive systems . .Clinical Nutrition Service, 6th of October University Hospital, 6th of October City, Giza, Egypt . Subfertility, Chapter 1, 1-38

2.- Stefan Schlatt et al. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. Seminars in Cell & Developmental Biology 29 (2014) 2–16 . DOI: <https://doi.org/10.1210/endo/bqab046>.

3.- Naina Kumar et al. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. Biology of Reproduction, Volume 104, Issue 3, March 2021, Pages 508–520, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa213>

- 4.-David Mortimer. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 2018 Dec 1;24(12):567-592.doi: 10.1093/molehr/gay040.
- 5.- Stefan Schlatt . Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *emin Cell Dev Biol.* 2014 May;29:2-16. doi: 10.1016/j.semcd.2014.03.007.
- 6.- Donald P. Evenson, Ph.D et al. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity . *Fertility and Sterility* Vol. 114, No. 2, August 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.03.028>.
- 7.- Cecilia Inés Gayet, Fatima Juárez. Nuevo escenario de baja fecundidad en México a partir de información censal. INEGI. Realidad, datos y espacio revista internacional de estadística y geografía. Vol. 12, Núm. 3, septiembre-diciembre, 2021. 2022.
- 8.- Ala'a Farkouh et al. Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians.*Transl Androl Urol* 2022;11(7):1023-1044 <https://dx.doi.org/10.21037/tau-22-149>
- 9.- Ujval Ishu Pathak. Cutting-Edge Evaluation of Male Infertility. *rol Clin North Am.* 2020 May;47(2):129-138.doi: 10.1016/j.ucl.2019.12.001.
- 10.- Lars Björndahl.The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. *Fertil Steril.* 2022 Feb;117(2):246-251. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.12.012.Epub 2022 Jan 2.
- 11.-Allan Pacey Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Res Clin Obstet Gynaecol* 2018 Nov;53:11-19.
- 12.-Yingwei Zhang. Dynamic DNA Structures. *Small.* 2019 Jun;15(26):e1900228.doi: 10.1002/smll.201900228. Epub 2019 Apr 10.

- 13.-Goran Gajski . Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021 Jul-Dec;788:108398.doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108398. Epub 2021 Nov 9.
- 14.- Ryan B Jensen Preserving genome integrity in human cells via DNA double-strand break repair. *Mol Biol Cell*. 2020 Apr 15;31(9):859-865.doi: 10.1091/mbc.E18-10-0668.
- 15.- Maartje Cissen et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Nov 10;11(11):e0165125. doi: 10.1371/journal.pone.0165125.eCollection 2016.
- 16.- Pavlína Majtnerová et al. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *ol Biol Rep*. 2018 Oct;45(5):1469-1478. doi: 10.1007/s11033-018-4258-9.
- 17.-Sulagna Dutta. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2021;53:e13718 . <https://doi.org/10.1111/and.13718>
- 18.-Allan Pacey Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Res Clin Obstet Gynaecol* 2018 Nov;53:11-19.
19. Ribas-Maynou J, Benet J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. *Genes (Basel)* 2019;10:105.
- 20.- González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 2012;13:14026-52.

- 21.- Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019;33:117-26.
- 22.-García-Rodríguez A, Gosálvez J, Agarwal A, et al. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. *Int J Mol Sci* 2018;20:31.
- 23.-Vanessa A. Comar et al. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction* 2017;21(4):306-312 doi: 10.5935/1518-0557.20170052.
- 24.- Zeynep Caliskan et al. Evaluation of sperm DNA fragmentation in male infertility . *Andrologia*. 2022;54:e14587. DOI: 10.1111/and.14587
- 25.-Tsuyoshi Okubo et al. Performing a sperm DNA fragmentation test in addition to semen examination based on the WHO criteria can be a more accurate diagnosis of IVF outcomes. *BMC Urology (2023) 23:78* <https://doi.org/10.1186/s12894-023-01257-y>
- 26.-Kaarouch I, Bouamoud N, Madkour A, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M, Sefrioui O. Paternal age: negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. *Mol Reprod Dev*. 2018; 85:271–80. <https://doi.org/10.1002/mrd.22963> PMID:29392876
- 27.-Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online*. 2007; 15:514–19. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60382-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60382-3) PMID:18028741
- 28.-Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26:41–46. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9277-3> PMID:19030983

- 29.-Aleksandra Rosiak-Gill. Age-related changes in human sperm DNA integrity. *Aging* (Albany NY). 2019 Aug 13;11(15):5399-5411. doi: 10.18632/aging.102120.
- 30.-Láyonal Germán Acosta Campos. Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center . *JBRA Assisted Reproduction* 2021;**25**(3):349-357 doi: 10.5935/1518-0557.20200079
- 31.- Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod*. 2002;8:719–721. doi: 10.1093/molehr/8.8.719.
- 32.- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004;19(3):611–5.
- 33.- Agarwal A, Panner Selvam MK, Baskaran S, Cho CL. Sperm DNA damage and its impact on male reproductive health: a critical review for clinicians, reproductive professionals and researchers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(6):443–57.
34. -Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015;103:e18-25.
- 35.- ESHRE Guideline Group on RPL; Bender Atik R, Christiansen OB, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* 2018;2018:hoy004.
- 36.-.Salonia A, Bettocchi C, Carvalho J, et al. European Association of Urology: EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health. *Eur Assoc Urol* 2020. Available online: <https://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-on-Sexual-and-Reproductive-Health-2020.pdf>
- 37.-Boitrelle F, Shah R, Saleh R, et al. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life* (Basel) 2021;11:1368.

38.- Le MT, Nguyen TAT, Nguyen HTT, Nguyen TTT, Nguyen VT, Le DD, Nguyen VQH, Cao NT. Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol.* 2019;18(4):390–6.

39.- Sandro C Esteves et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia.* 2021 Mar;53(2):e13874. doi: 10.1111/and.13874. Epub 2020 Oct 27.