



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL**

“Asociación de la Fragmentación de DNA Espermático con Parámetros Seminales y Estilo de Vida en la Población Mexicana y su Impacto en la Tasa de Fertilización”

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN HUMANA PRESENTADA POR**

DR. PABLO JOAQUÍN CERVANTES MONDRAGÓN

ASESOR INVESTIGADOR:

DR. HÉCTOR SALVADOR GODOY MORALES.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO 2019





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.

“Asociación de la Fragmentación de DNA Espermático con Parámetros Seminales y Estilo de Vida en la Población Mexicana y su Impacto en la Tasa de Fertilización”

DRA. RAQUEL OCAMPO LUJANO

DIRECTORA GENERAL

Hospital Angeles del Pedregal

DR. ENRIQUE JUAN DÍAZ GREENE

JEFE DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA

Hospital Angeles del Pedregal

DR. HÉCTOR SALVADOR GODOY MORALES

PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD

Hospital Angeles del Pedregal

ÍNDICE

Resumen.....	4
Marco Teórico.....	6
Hipótesis	15
Objetivos	
Objetivo General.....	16
Objetivos específicos.....	16
Material y Métodos.....	17
Selección de muestra.....	18
Criterios de selección	
Criterios de inclusión.....	18
Criterios de exclusión.....	19
Criterios de eliminación.....	19
Procedimiento para obtener la información.....	19
Determinación del tamaño de la muestra	20
Análisis Estadístico.....	20
Aspectos éticos.....	21
Resultados.....	22
Discusión.....	23
Conclusiones.....	23
Bibliografía.....	29

“Asociación de la Fragmentación de DNA Espermático con Parámetros Seminales y Estilo de Vida en la Población Mexicana y su Impacto en la Tasa de Fertilización”

Antecedentes Infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo espontáneo después de un año de relaciones sexuales sin la utilización de métodos anticonceptivos en los días fértiles. El factor masculino es el único responsable en el 20% de los casos, y contribuye a la infertilidad de pareja en el 50% de las ocasiones. Las causas son varias y de origen complejo. Factores en el estilo de vida como índice de masa corporal, hipertermia escrotal, tabaquismo se relacionan a una fragmentación espermática aumentada.

Objetivos Analizar la relación entre los parámetros seminales y el resultado de la fragmentación espermática. Establecer la relación entre la fragmentación espermática con índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo, actividad física aeróbica y edad de los pacientes, analizar el impacto del porcentaje de la fragmentación espermática con la tasa de la fertilización y el uso de la fragmentación espermática como predictor del porcentaje de fertilización.

Materiales y Métodos Estudio retrospectivo y observacional efectuado en pacientes que acudieron de 2014 a 2019 a la clínica de reproducción del Hospital Angeles del Pedregal debido a infertilidad. A todos se les realizó el análisis seminal conforme a lo señalado en la quinta edición del *Manual de la OMS* y el test de dispersión de la cromatina espermática, con un equipo Ha- losperm[®] (Halotech DNA SL). Las muestras del eyaculado se obtuvieron posterior a 3 – 5 días de abstinencia sexual

Resultados Se incluyeron un total de 108 pacientes con una edad mediana de 39 años (+/-7.2), con una media de abstinencia de 4.2 días (+/- 1.1 días) de los cuales presentaron tabaquismo 48.1%, alcoholismo 50.9%, ejercicio 24.1%, con una media de índice de masa corporal de 26.75 Kg/m², una media de fragmentación espermática (DFI) 24.5%, la tasa de fertilización fue 60%, se dividieron en tres grupos respecto al porcentaje de fragmentación espermática leve (<15%) 19 pacientes, moderada (15%-30%) 58 pacientes y severa (>30%) 31 pacientes. Se realizó U Mann Whitney para relacionar fragmentación espermática con índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo y actividad física aeróbica, se encontró que pacientes con una fragmentación espermática severa presentaban alto índice de tabaquismo $p < 0.0005$. Se realizó una correlación de Spearman entre fragmentación espermática, parámetros seminales y tasa de fertilización, un análisis bivariado reportó una correlación inversa entre fragmentación espermática y concentración espermática -0.325 (32.5%) $p < 0.0001$, fragmentación espermática y morfología -0.269 (26.9%) $p < 0.005$, fragmentación espermática y motilidad -0.313 (31.3%) $p < 0.0001$, y fragmentación espermática y tasa de fertilización 0.328 (32.8%) $p < 0.001$.

Conclusión Con base a los resultados de este estudio los parámetros seminales no evalúan en su totalidad el factor masculino, es necesario complementarlo con la fragmentación espermática. Como se demostró en este estudio el tabaquismo afecta inversamente a los parámetros seminales y la tasa de fertilización por lo que en la valoración inicial de paciente con infertilidad recomendamos ampliamente la suspensión de tabaquismo.

SUMMARY

" ASOCIATION OF DNA SPERM FRAGMENTATION WITH SEMEN PARAMETERS AND LIFESTYLE IN MEXICAN POPULATION AND ITS IMPACT IN FERTILIZATION RATE "

Objective: Given the limitations of conventional semen parameters evaluation, other techniques have been made to identify other useful sperm biomarkers. Sperm DNA integrity has gained interest as it has an important role in embryo development and reproductive outcomes, it is use as a complementary diagnostic method often routinary to measure the proportion of sperm with damaged chromatin in the neat ejaculate. The objective of this study was to determine the impact of DNA fragmentation index (DFI) in fertilization rate and to evaluate the correlations with lifestyle factors and semen parameters.

Design: Retrospective cohort analysis.

Material and Methods: We retrospectively conducted a review of 108 subfertile patients that were tested in fertility clinic that underwent study protocol with spermatobioscopy and DFI before ICSI, from January 2017 to January 2019 at an infertility clinic in Mexico City. The study parameters were sperm DFI, semen parameters, male age, BMI, presence of lifestyle factors, smoking, alcohol use, exercise and fertilization rate. The semen parameters were categorized based on DFI <15% low, 15-30% moderate and >30% high. The study was institutional review board approved.

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Results: A total of 108 patients were studied with spermatobioscopy and DFI and underwent ICSI, the mean age was 39 years (+/-7.2), smoking 48.1%, alcohol 50.9%, excersise 24.1%, mean BMI index 26.75 Kg/m², mean DFI 24.5%, the mean fertilization rate was 60%, we divided into three groups based on DFI. U Mann-Whitney was used and it reported that patients with high DFI had a higher smoking rate with a p<000.5, age was statistically significant in patients with DFI >30, A Spearman correlation was done between DFI, seminal parameters, and fertilization rate, bivariate analysis reported an inverse correlation between DFI and sperm concentration -.325 (32.5%) p<.0001, DFI and morphology -.269 (26.9%) p<.005, DFI and motility -.313 (31.3%) p<.0001, and an inverse correlation between DFI and fertilization rate .328 (32.8%) p<.001. The patients that reported a DFI >30 had a OR of 3.86 for presenting teratozoospermia compared to patients with DFI<30 and a OR of 4.82 for presenting asthenozoospermia compared with patients with DFI <30. The semen parameters concentration, morphology and motility had an inverse correlation to DFI parameters, fertilization rate had an inverse correlation to DFI.

Conclusions: Our results allow us to propose that DFI screening should be used as a complementary sperm parameter participating in semen quality evaluation by providing useful information in the diagnosis of male infertility.

MARCO TEÓRICO

Introducción

Infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo espontáneo después de un año de relaciones sexuales sin la utilización de métodos anticonceptivos en los días fértiles. Aproximadamente 15% de las parejas presentaran infertilidad al termino de un año. (1) El factor masculino es el único responsable en el 20% de los casos, y contribuye a la infertilidad de pareja en el 50% de las ocasiones (2). Cuando se está frente a un factor masculino, casi siempre se observará una alteración cuantitativa o cualitativa de uno o más parámetros seminales.

La infertilidad masculina puede ser provocada por varias causas. Algunas de ellas se pueden identificar y tratar, como el hipogonadismo hipogonadotrópico; otras se logran diagnosticar, pero no cuentan con un tratamiento específico, como alteraciones genéticas o atrofia testicular. En el 30-40% de los pacientes con alteraciones del espermiograma, el examen físico y las pruebas de laboratorio no logran identificar una causa específica de la infertilidad.

Las diferentes técnicas de recuperación espermática, que extraen gametos de diferentes regiones del sistema reproductor masculino, han logrado que parejas con factor masculino severo sin tratamiento específico puedan lograr embarazos.

Evaluación del hombre infértil

Se debe realizar una evaluación del factor masculino cuando no se logra embarazo después de un año de relaciones sexuales adecuadas sin protección en los días fértiles. Dicha evaluación se debe realizar antes de un año si existen factores de riesgo para infertilidad masculina (ej. Antecedente de criptorquidia bilateral, lesión testicular o datos de hipogonadismo) o femenina (ej. edad mayor a 35 años, antecedente de dos o más abortos espontáneos, antecedente de embarazos previos con malformaciones o alteraciones cromosómicas) dentro de la pareja (3). La edad femenina es una variable importante para lograr éxito en reproducción asistida (1,4). Los otros factores pronósticos son la duración de la infertilidad, si es primaria o secundaria, los tipos de alteraciones del espermiograma y la reserva ovárica femenina(1).

Existen múltiples causas de infertilidad masculina, las que se presentan en la Tabla 1. Pueden ser congénitas o adquiridas. Secundarias a patología pre-testicular (eje hipotálamo-hipófisis-gónadas), testicular o post-testicular (desde testículo hasta conductos eyaculadores) (5). Se asume que la infertilidad idiopática está causada por múltiples factores, como alteraciones endocrinas, estrés oxidativo, alteraciones genéticas y epigenéticas (1).

Diagnóstico diferencial de la infertilidad masculina (Tabla 1)

Causas pre-testiculares

Hipogonadismo hipogonadotrófo congénito

Patología hipofisiaria: tumores, enfermedades infiltrativas e infartos

Patología suprarrenal: tumores e hiperplasia suprarrenal congénita

Infecciones sistémicas, incluyendo enfermedades virales y tuberculosis

Neoplasias sistémicas

Abuso de esteroides anabólicos

Causas testiculares

Varicocele

Síndrome de Klinefelter

Microdeleciones del cromosoma Y

Tumores de células germinales

Tumores de células de Leydig o de células de Sertoli

Falla testicular idiopática

Daño vascular o traumático

Orquitis previa

Exposición a gonadotoxinas: quimioterapia, radiación, fármacos, calor

Causas post-testiculares

Obstrucción epididimaria congénita, iatrogénica o postinflamatoria

Obstrucción de conductos deferentes congénita, iatrogénica o postinflamatoria

Obstrucción de conductos eyaculadores

Disfunción sexual o eyaculatoria

Modificado de Stahl P, Stember D, Goldstein M. Annu Rev Med 2012; 63:525-540.

La evaluación básica del paciente que consulta por infertilidad incluye (3,5): tabla 2

1. Anamnesis médica y sexual
2. Examen físico
3. Dos Espermatozoides directas
4. Perfil endocrínicos Masculino
5. Análisis de Orina Post - eyaculación
6. Estudios de Imagen (ej. Ultrasonido testicular o transrectal)
7. Evaluación Genética
8. Pruebas Especializadas

Anamnesis

La anamnesis tiene como objetivo identificar factores de riesgo o hábitos de comportamiento que pueden tener una repercusión sobre la fertilidad del paciente como tabaquismo, alcoholismo, edad y ejercicio. Se debe investigar acerca de enfermedades previas o actuales, con énfasis en el sistema reproductor (criptorquidia, infecciones de transmisión sexual, entre otras) y respiratorio (infecciones respiratorias a repetición pueden estar reflejando fibrosis quística). Se debe preguntar acerca de cirugías previas, con especial énfasis en cirugía inguinal, retroperitoneal o genital (5).

Se debe conocer la historia reproductiva previa de los integrantes de la pareja y los hábitos sexuales actuales (frecuencia de relaciones sexuales y utilización de lubricantes). Alteraciones de la libido, disfunción eréctil y alteraciones de la eyaculación deben ser identificadas. Se deben revisar los fármacos y drogas utilizadas en el presente y pasado. Por último, se debe conocer acerca de exposiciones ambientales a tóxicos que puedan afectar la fertilidad del paciente (3,5).

Examen físico

Se debe iniciar el examen físico con la inspección general del paciente, buscando alteraciones del hábito corporal, alteraciones de los caracteres sexuales secundarios, presencia de ginecomastia y/o cicatrices de cirugías previas. Se debe examinar el pene, incluyendo la posición del meato urinario y estigmas de infecciones de transmisión sexual. Se deben palpar los testículos, evaluando tamaño, consistencia o presencia de zonas induradas. Los epidídimos deben ser identificados, evaluando la presencia de dilatación, induración o dolor a la palpación (5).

Se deben identificar ambos conductos deferentes. La ausencia de ambos conductos puede estar en el contexto de agenesia congénita bilateral de conductos deferentes (CBAVD), manifestándose como azoospermia obstructiva. La ausencia de sólo uno de ellos puede reflejar alteraciones embrionarias del conducto mesonéfrico, lo que se asocia a agenesia renal ipsilateral. El examen debe finalizar con un tacto rectal, aprovechando de evaluar la indemnidad de los reflejos espinales a nivel sacro (3,5).

Análisis seminal

El análisis de los parámetros seminales es una forma fundamental en la evaluación andrológica del hombre que consulta por infertilidad. La metodología para procesar y analizar muestras de semen humano ha sido publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6). Las muestras pueden ser recolectadas en el hogar con preservativo especial o en el laboratorio, debiendo ser mantenidas a temperatura ambiente y analizadas dentro de una hora. El paciente debe haber mantenido abstinencia sexual por 3 a 5 días (3). Los valores de normalidad y anormalidad de los diferentes parámetros medidos en la espermatoescopia han cambiado durante los años. Los valores de referencia actuales son los publicados por la OMS en 2010, derivados de un estudio poblacional internacional de hombres fértiles (1). Los valores anormales se definieron como los que se encuentran bajo el percentil 5 y se presentan en la tabla 3

Criterios de anormalidad de parámetros seminales (percentil 5) oms 2010

PÁRAMETRO	VALOR EN P5
Volumen seminal	1,5mL
Número de total de espermatozoides	39 millones / eyaculado
Concentración de espermatozoides	15 millones / mL
Movilidad total (progresiva+no progresiva)	40 %
Movilidad progresiva	32 %

PÁRAMETRO	VALOR EN P5
Vitalidad (espermatozoides vivos)	58%
Morfología (formas normales)	4 %
pH	> 7,2
Leucocitos	< 1 millón / mL

Modificado de Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62:324-32.

Un volumen seminal bajo 1,5 ml puede ser el resultado de recolección incompleta de la muestra, baja testosterona, eyaculación retrógrada u obstrucción de los conductos eyaculadores. Esta última se sospecha cuando el semen tiene un pH < 7,2 con baja fructosa (ausencia del aporte alcalino, rico en fructosa, de las vesículas seminales) (5).

Oligozoospermia se define como una concentración espermática bajo el percentil 5 (15 millones/ml), y puede estar reflejando múltiples condiciones. No se debe diagnosticar azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado) hasta centrifugar la muestra. Si posteriormente se confirma la ausencia de espermatozoides, se debe continuar el estudio para diferenciar si es que se está frente a una azoospermia obstructiva (OA) o no obstructiva (NOA) (1,3,5).

La presencia de leucocitozoospermia (>1 millón de leucocitos/ml) puede estar reflejando una infección genitourinaria. La anamnesis, examen físico y estudios microbiológicos específicos podrán confirmar el diagnóstico. En el análisis seminal no se debe considerar como sinónimos las células redondas y los leucocitos, ya que las primeras también reflejan la presencia de células germinales inmaduras en el eyaculado.

Astenozoospermia se define, según los criterios de OMS 2010, como una movilidad progresiva menor a 32% o una movilidad total menor a 40%. Es una variable inespecífica, que puede estar en el contexto de varicocele, defectos espermáticos ultraestructurales, anticuerpos anti-espermáticos, o puede ser idiopática (5). Teratozoospermia se define como menos de 4% de formas normales, y se ha relacionado con fracaso en técnicas de reproducción asistida como fertilización in vitro (FIV) o inseminación intrauterina (IUI). No se ha descrito una clara influencia sobre el éxito en embarazos producto de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o embarazos espontáneos (7, 8).

Evaluación endocrina

Las alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas son causas frecuentes de infertilidad masculina. Con una adecuada evaluación endocrina, se pueden diferenciar fallas testiculares primarias (hipogonadismo hipergonadotrófico) de fallas hipofisarias o hipotalámicas (hipogonadismo hipogonadotrófico). Está indicada una evaluación básica con hormona folículo estimulante (FSH) y testosterona en todos los pacientes con alteraciones en el espermiograma, alteraciones de la función sexual o con hallazgos clínicos sugerentes de endocrinopatía (3).

Si el nivel de testosterona es bajo, se debe completar el estudio con hormona luteinizante (LH) y prolactina. Los micro y macroadenomas productores de prolactina son los tumores hipofisarios más comunes, produciendo un efecto negativo sobre las células productoras de gonadotropinas. La medición de prolactina será de especial importancia en pacientes con disminución de la libido, disfunción sexual, ginecomastia o galactorrea (5). Una FSH normal no garantiza una función testicular normal, sin embargo, una FSH elevada es indicativa de una falla en la espermatogénesis (1).

Análisis de orina post-eyaculación

Se debe realizar este examen a todos los pacientes con un volumen seminal menor a 1,5ml, en los cuales se ha descartado previamente CBAVD e hipogonadismo. Esta prueba se realiza centrifugando la muestra seminal por 10 minutos a 300xg, con posterior observación del pellet con una magnificación de 400x. La observación de un número significativo de espermatozoides es indicativa de eyaculación retrógrada (1).

Ecotomografía testicular y transrectal

Se debe realizar una ecotomografía testicular a los pacientes en que existe dificultad o imposibilidad de realizar un adecuado examen escrotal (obesos, cirugía escrotal previa, testículos altos o grandes hidroceles). Con este examen se podrá objetivar patología testicular, epididimaria o del cordón espermático. La ecotomografía escrotal también debe ser solicitada cuando, en el examen físico, se palpa una masa testicular sospechosa (5). Se podría recomendar este examen a todos los pacientes que presentan alteraciones en el espermiograma, por el mayor riesgo de cáncer testicular descrito en este grupo específico.

La ecotomografía transrectal está indicada en el estudio de azoospermia u oligozoospermia de origen obstructivo. Se debe solicitar en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa con muestras seminales de bajo volumen, acidóticas, de baja fructosa. La visualización de vesículas seminales dilatadas (diámetro anteroposterior mayor a 2cm), conductos eyaculadores dilatados o quistes prostáticos de línea media apoyan el diagnóstico de obstrucción parcial o completa de conductos eyaculadores (3,9).

Pruebas genéticas

Anormalidades cariotípicas y microdeleciones del cromosoma Y son comunes en pacientes con alteración de la espermatogénesis (3). Se observan alteraciones cromosómicas, como deleciones, translocaciones, duplicaciones e inversiones en el 6% de los hombres con infertilidad. Su transmisión a la descendencia puede resultar en abortos espontáneos, malformaciones congénitas, infertilidad masculina y una diversidad de síndromes genéticos. El síndrome de Klinefelter (47 XXY) es, por mucho, la anomalía cromosómica más diagnosticada en estos pacientes; 1 de cada 500 hombres en la población general presenta esta genopatía (5).

Aproximadamente, el 10 a 13% de pacientes con azoospermia es portador de una microdelección del cromosoma Y (11). Pudiendo ser diagnosticadas utilizando *sequence tagged sites* y reacción en cadena de la polimerasa. Su diagnóstico tiene implicancias pronósticas y éticas. La identificación de microdeleciones AZFa y AZFb se asocia a síndrome de *Sertoli solo* y detención de la maduración, no existiendo posibilidad de encontrar gametos viables con ninguna técnica de recuperación espermática. La microdelección AZFc se asocia a oligozoospermia severa, existiendo un éxito cercano al 80% de recuperación espermática para su posterior utilización en ICSI. Esta mutación se transmitirá de forma invariable a la descendencia masculina, provocando infertilidad en estos individuos (12-14).

Se recomienda solicitar consejería genética, cariotipo y microdeleciones del cromosoma Y a todos los pacientes con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa (< 5 millones por ml). El 70% de los pacientes con CBAVD sin síntomas o signos de fibrosis quística pose una mutación del gen del receptor de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) (15,16). Aunque se han descrito más de 1300 mutaciones para CFTR, las pruebas más utilizadas se basan en la búsqueda de 30 a 50 mutaciones más comunes; por lo que un resultado negativo no es sinónimo de ausencia de una mutación. La mayoría de los pacientes con agenesia de conductos deferentes, presentan también hipoplasia o agenesia de vesículas seminales, presentando bajo volumen de eyaculado. En pacientes azoospermicos con agenesia unilateral, la realización de una ecotomografía transrectal puede confirmar atresia contralateral de conductos deferentes o vesículas seminales, explicando una azoospermia obstructiva (3,17).

Se les debe ofrecer detección de mutación de CFTR y consejería genética a todos los hombres con CBAVD. También se le debe ofrecer a la pareja femenina, si es que se utilizará el semen de un paciente con CBAVD en técnicas de reproducción asistida. Se debe indicar estudio ecográfico renal a pacientes con agenesia unilateral de conductos deferentes, para identificar posibles malformaciones renales. Por último, se debe considerar secuenciar el gen CFTR completo en pacientes con CBAVD con un panel de mutaciones negativo y una pareja femenina portadora de mutaciones del gen de la fibrosis quística (3).

Pruebas especializadas (Integridad del DNA)

La medición de integridad del DNA se refiere a una variedad de pruebas de laboratorio que evalúan el grado de fragmentación del DNA espermático (3). Las dos pruebas más utilizadas son el *sperm chromatin structure assay* (SCSA) y el *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end-labeling* (TUNEL). La primera informa el porcentaje de espermatozoides con DNA desnaturalizado (una hebra), denominado índice de fragmentación del DNA, cuyo valor normal es 20%. La segunda prueba objetiva los espermatozoides con hebras de DNA fragmentados mediante marcación con un fluoróforo, los resultados se expresan con el porcentaje de espermatozoides positivos para TUNEL. Existe controversia en relación a la utilidad de estas pruebas (5,17). Diversos estudios han relacionado la fragmentación del DNA con fracaso en concepción natural e IUI. El valor pronóstico en pacientes sometidos a FIV e ICSI no es muy claro (19-21).

Anticuerpos antiespermáticos

Las tasas de embarazo parecieran estar reducidas cuando existen anticuerpos antiespermáticos en el semen (22). Los factores de riesgo para presentar estos anticuerpos son obstrucción ductal, infecciones genitales, trauma testicular, cirugías testiculares/epididimarias y antecedentes de vasectomía. Se debe considerar solicitarlos en pacientes con astenozoospermia, aglutinación espermática o un test post-coital anormal (3).

Otras pruebas especializadas

Las pruebas de viabilidad espermática, mediante tinción supravital o test hiposmótico, son útiles en pacientes con astenozoospermia; para diferenciar espermatozoides muertos de inmóviles, que podrían ser utilizados posteriormente en ICSI. El test post-coital es la examinación microscópica del mucus cervical, realizado antes de la ovulación, unas horas después de una relación sexual. Determina si los espermatozoides alcanzan y penetran la barrera del mucus cervical. Puede ser útil en casos de semen hiperviscoso, infertilidad no explicada, concentración espermática normal en eyaculados de alto o bajo volumen y en los casos de anatomía peneana anormal (5).

Las pruebas de función espermática, como la prueba de penetración espermática, la evaluación de reacción acrosomal y la prueba de hemizona, evalúan la capacidad de adhesión y penetración de los espermatozoides en el ovocito. Pueden estar indicadas cuando se debe decidir la técnica de reproducción asistida más adecuada o cuando se está investigando la causa de fracasos recurrentes en reproducción asistida (3, 5). En el líquido seminal, leucocitos y espermatozoides defectuosos producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Diversos estudios han postulado que el desbalance entre ROS y sustancias antioxidantes (estrés oxidativo) juega un rol fundamental en diversas condiciones relacionadas a infertilidad masculina, como el varicocele. Actualmente existen pruebas de laboratorio que cuantifican el daño oxidativo de diferentes estructuras espermáticas. La medición de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina refleja la acción oxidante de ROS sobre el DNA espermático (3).

Dado las limitaciones convencionales en los parámetros seminales para valorar el factor masculino, otras técnicas se han identificado como biomarcadores espermáticos, la integridad del DNA espermático ha generado interés en el papel que desempeña durante el desarrollo embrionario y su impacto en los resultados reproductivos.¹

Debido a que del 30 al 50% de los casos de infertilidad se deben a defectos espermáticos^{1,2}. Las causas de daño espermático son varias y de origen complejo, pueden ser causas testiculares o post testiculares, defectos en espermatogénesis, genéticas o anomalías en el desarrollo, testicular o post testicular por lesión, como sustancias gonadotóxicas, hipertermia, oxidantes, defectos endocrinos, deficiencia de protamina con una remodelación de cromatina aberrante, especies reactivas de oxígeno, apoptosis.^{3,4}

Factores en el estilo de vida como índice de masa corporal, hipertermia escrotal, tabaquismo se relacionan a una fragmentación espermática aumentada.^{5,6}

La fragmentación espermática ha surgido como un diagnóstico complementario con opción a que sea de rutina para proporcionar información sobre el daño en la cromatina,⁷ usando sondas, se puede identificar el daño al DNA y cuantificar mediante fluorescencia microscópica, microscopio óptico y citometría de flujo. Se ha reportado una mayor cantidad del daño a cromatina espermática en pacientes infértiles,^{8,9} el hallazgo de fragmentación espermática elevada en pacientes con parámetros seminales normales no es inusual.¹⁰

En los últimos años el estudio del factor masculino ha proporcionado información que una elevación en los niveles de fragmentación espermática afecta negativamente la probabilidad de lograr un embarazo aun con técnicas de reproducción asistida¹¹. El porcentaje de fragmentación espermática puede ser un parámetro importante a considerar cuando se escoge el método de fertilización en el laboratorio, FIV o ICSI.¹²

En 2017 se realizó un metanálisis, donde se incluyeron 56 estudios y 8,068 ciclos, Simon et al. donde se demostró una tasa de embarazo mayor en pacientes con una fragmentación espermática leve en comparación con pacientes que presentaban niveles elevados de fragmentación espermática FIV (OR 1.65, 95% CI 1.34–2.04; $P < 0.0001$) y mediante ICSI (OR 1.31, 95% CI 1.08–1.59; $P = 0.0068$). Osman et al demostró evidencia donde seis estudios reportaban una tasa de nacido vivo más alta en pacientes con fragmentación espermática leve y mediante FIV (RR 1.27, 95% CI 1.05–1.52; $P = 0.01$)¹³

Se ha demostrado que el riesgo de aborto o pérdida gestacional aumenta tanto en FIV e ICSI en parejas donde se reporta una fragmentación espermática elevada. Un metanálisis, de 11 estudios que incluyó 1,549 ciclos de FIV e ICSI demostró una probabilidad de presentar un aborto de 2.48 veces mayor en pacientes con fragmentación espermática elevada (95% CI 1.52–4.04; $P < 0.0001$)^{14,15} Todos estos estudios recomiendan realizar ICSI a FIV como método de fertilización.^{16,17}

HIPÓTESIS

H1

La alteración uno o más parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad, leucospermia, vitalidad, morfología) afectará el resultado de la fragmentación espermática y la tasa de fertilización

H0

Analizar la relación de la fragmentación espermática con índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo, actividad física aeróbica y edad de los pacientes y el impacto del porcentaje de la fragmentación espermática con la tasa de la fertilización y el uso de la fragmentación espermática como predictor del porcentaje de fertilización.

OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo principal de este estudio consiste en analizar la relacion entre los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad, leucospermia, vitalidad, morfología) y el resultado de la fragmentación espermática.

Objetivos Específicos:

- Analizar la relacion de la fragmentación espermática con índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo, actividad física aeróbica y edad de los pacientes.
- Analizar el impacto del porcentaje de la fragmentacion espermática con la tasa de la fertilización.
- Analizar el porcentaje de la fragmentacion espermática como predictor del porcentaje de fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo y observacional efectuado en pacientes que acudieron de 2014 a 2019 a la clínica de reproducción del Hospital Angeles del Pedregal debido a infertilidad. A todos se les realizó el análisis seminal conforme a lo señalado en la quinta edición del *Manual de la OMS* y el test de dispersión de la cromatina espermática, con un equipo Ha- losperm[®] (Halotech DNA SL). Las muestras del eyaculado se obtuvieron posterior a 3 – 5 días de abstinencia sexual

Enseguida se procedió a realizar el seminograma y la valoración del grado de fragmentación del ADN espermático de la muestra seminal mediante el equipo de Halosperm[®]

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0. Se analizaron las distribuciones de las variables y, en los casos en que fue necesario, se normalizaron mediante transformación logarítmica. Las diferencias entre grupos se analizaron con análisis de varianza ANOVA. Se realizó Correlación de Spearman . Las relaciones entre las variables se estudiaron mediante Chi Cuadrada, Kruskal – Walls se obtuvieron las estimaciones del riesgo (OR) mediante la realización de tablas de contingencia. Las correlaciones y las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando fueron menores de 0.05.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Universo de trabajo

Pacientes que cumplieron con los criterios diagnóstico de infertilidad con factor masculino atendidos en la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital Ángeles del Pedregal durante el periodo comprendido de Enero del 2014 a Septiembre del 2017.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de infertilidad.
- Diagnóstico de factor masculino alterado.

Criterios de exclusión

- Pacientes que no cuenten con criterios diagnósticos
- Pacientes con antecedente de vasectomía.
- Pacientes sin espermatobioscopía directa.
- Pacientes sin fragmentación espermática.

Criterios de eliminación

- Expedientes incompletos
- Pacientes que no continuaron con el tratamiento de reproducción asistida

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER INFORMACIÓN

Se revisaron los expedientes correspondientes de pacientes con que hayan cumplido los criterios de inclusión, se registró toda información requerida mediante una hoja de captura de datos para posteriormente vaciarlo a una base de datos mediante Microsoft Excel.

DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA DE TRABAJO

La primera fase consistió en la revisión y recolección de datos de los expedientes de las pacientes que cumplan con los criterios de inclusión para este estudio, por medio de la hoja de recolección de datos, llenando cada uno de los rubros pertinentes.

La segunda fase consistió en el vaciado de las hojas de recolección de datos a una base de datos de Microsoft Excel para su posterior migración al programa estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0. para su análisis estadístico.

La tercera fase consistió en la interpretación y redacción de resultados y conclusiones para el desarrollo de este trabajo en tiempo y forma.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 17.0. Se analizaron las distribuciones de las variables y, en los casos en que fue necesario, se normalizaron mediante transformación logarítmica. Las diferencias entre grupos se analizaron con análisis de varianza ANOVA. Se realizó Correlación de Spearman. Las relaciones entre las variables se estudiaron mediante Chi Cuadrada, Kruskal – Walls se obtuvieron las estimaciones del riesgo (OR) mediante la realización de tablas de contingencia. Las correlaciones y las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando fueron menores de 0.05.

ASPECTOS ÉTICOS

La presente investigación se realizó de acuerdo con lo estipulado en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y los lineamientos de Helsinki. El protocolo de la investigación se envió, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación del Hospital Angeles del Pedregal.

La investigación no implicó riesgo a la población ni tiene implicaciones éticas y tampoco existió ningún conflicto de interés con alguna empresa comercial.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 108 pacientes con una edad mediade 39 años (+/-7.2), con una media de abstinencia de 4.2 días (+/- 1.1 días) de los cuales presentaron tabaquismo 48.1%, alcoholismo 50.9%, ejercicio 24.1%, con una media de índice de masa corporal de 26.75 Kg/m², una media de fragmentacion espermatica (DFI) 24.5%, la tasa de fertilizacion fue 60%, se dividieron en tres grupos respecto al porcentaje de fragmentación espermática leve (<15%) 19 pacientes, moderada (15%-30%) 58 pacientes y severa (>30%) 31 pacientes.

Se realizó U Mann Whitney para relacionar fragmentación espermática con índice de masa corporal, tabaquismo, alcoholismo y actividad física aeróbica, se encontró que pacientes con una fragmentacion espermática severa presentaban alto indice de tabaquismo $p<000.5$. Se realizó una correlación de Spearman entre fragmentación espermática, parametros seminales y tasa de fertilizacion, un análisis bivariado reporto una correlación inversa entre fragmentación espermática y concentración espermática -0.325 (32.5%) $p<.0001$, fragmentación espermática y morfología -0.269 (26.9%) $p<.005$, fragmentación espermática y motilidad -0.313 (31.3%) $p<.0001$, y fragmentacion espermática y tasa de fertilización 0.328 (32.8%) $p<.001$.

Para poder calcular la estimación de riesgo (OR) de las variables relacionadas con la fragmentación del ADN, cada una se transformó a variable dicotómica: fragmentación del ADN (si el índice de fragmentación del ADN es $\geq 15\%$, no: índice de fragmentación del ADN es menor de 15%), fragmentación crítica del ADN (si el índice de fragmentación del ADN es $\geq 30\%$, no: si el índice de fragmentación del ADN es menor de 30%), concentración (muestra con oligozoospermia o sin oligozoospermia), progresivos (muestra con astenozoospermia o sin astenozoospermia), viables (muestra con necrozoospermia o sin necrozoospermia) y número total de alteraciones seminales (menos de tres alteraciones seminales, tres o más alteraciones seminales).

La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con oligozoospermia es más del doble (OR= 3.2) comparada con los pacientes sin oligozoospermia. La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con astenozoospermia es 4.28 veces mayor (OR=4.2) que en los pacientes sin astenozoospermia. La probabilidad de encontrar fragmentación en los pacientes con necrozoospermia es 5 veces superior (OR=5) comparada con los pacientes sin necrozoospermia. Los parámetros seminales concentración, morfología y motilidad presentaron una clara correlación inversa a fragmentación espermática, así como la fragmentación espermática con la tasa de fertilización.

Conclusiones

Con base a los resultados de este estudio los parametros seminales no evaluan en su totalidad el factor masculino, es necesario complementarlo con la fragmentación espermática. Como se demostró en este estudio el tabaquismo afecta inversamente a los parámetros seminales y la tasa de fertilización por lo que en la valoración inicial de paciente con infertilidad recomendamos ampliamente la suspensión de tabaquismo o la disminución, aunque otros parametros como la obesidad y la actividad física no fueron estadísticamente significativa tambien se recomienda estar en un peso adecuado antes de iniciar cualquier técnica de reproducción asistida. Una fragmentación espermática por arriba de 27% se relaciona a una tasa de fertilización baja por lo que en estos pacientes el metodo ideal de fertilización es mediante ICSI.

Recomendamos el uso de la fragmentación espermática como un método de evaluación rutinario en todos los pacientes con infertilidad ya que proporcionan información adicional y pronostico de tasa de fertilización.

Análisis Cualitativo.

Análisis descriptivo:

Variable	Mediana	RIQ 25	RIQ 75	Mínimo	Máximo
Edad (años)	39.0	35.2	42	23	57
IMC (kg/m ²)	26.75	24.10	28.67	18.90	51-70

Variable		Frecuencia (n=108)	Porcentaje (%)
Tabaquismo	Ausente	56	51.9
	Presente	52	48.1
Alcoholismo	Ausente	53	49.1
	Presente	55	50.9
Ejercicio	Ausente	82	75.9
	Presente	26	24.1
Hipospermia (<1.5ml)	Ausente	90	83.3
	Presente	18	16.7
Oligospermia (<15mill/ml)	Ausente	94	87.0
	Presente	14	13.0
Teratozoopermia (<4% normales)	Ausente	90	83.3
	Presente	18	16.7
Astenozoospermia (<32% móviles)	Ausente	83	76.9

	Presente	25	23.1
Leucospermia (>1mill/ml)	Ausente	93	86.1
	Presente	15	13.9

Maniobra

Variable	Mediana	RIQ 25	RIQ 75	Mínimo	Máximo
FDNA	24.50	17.25	33.00	4	83
Variable	Frecuencia (n=108)		Porcentaje (%)		
Grado FDNA	Leve	20	18.5		
	Moderado	56	51.9		
	Severo	32	26.9		
FDNA mayor a 30	Ausente	76	70.4		
	Presente	32	29.6		

Desenlace

Variable	Mediana	RIQ 25	RIQ 75	Mínimo	Máximo
Fertilizados	5	3	8.5	0	39
Tasa fertilización (%)	60	50	74.8	0	100
Variable	Frecuencia (n=108)		Porcentaje (%)		
Tasa fertilización mayor a 50	Ausente	93	86.1		
	Presente	15	13.9		

Variables por grado de fragmentación.

Variable	Leve (n=20)		Moderado (n=56)		Severo (n=32)		Significancia
	Mediana	RIC 25,75	Mediana	RIC 25,75	Mediana	RIC 25,75	
Edad (años)	39	34.25, 42.75	37	34, 40	41.5	39.25, 44.25	<0.001
IMC (kg/m ²)	24.05	23.0, 26.35	26.65	24.10, 28.32	28.05	26.5, 29.95	<0.001

Prueba estadística aplicada: Kruskal-Wallis significativa ≤ 0.05

Variable	Leve (n=20)		Moderado (n=56)		Severo (n=32)		Significancia
	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	
Consumo de tabaco	8	15.4	22	42.3	22	42.3	0.021
Consumo Alcohol	7	12.7	29	52.7	19	34.5	0.100

Ausencia Ejercicio	14	17.1	42	51.2	26	31.7	0.345
--------------------	----	------	----	------	----	------	-------

Prueba estadística aplicada: Chi cuadrada de asociación lineal por lineal

VARIABLES POR FDNA MAYOR DE 30

Variable	Ausente (n=93)		Presente (n=15)		Significancia
	Mediana	RIC 25,75	Mediana	RIC 25,75	
Edad (años)	38	34, 40	41.5	39.25, 44.75	<0.001
IMC (kg/m²)	25.25	23.55, 28.0	28.05	26.5, 29.95	0.001

Prueba estadística aplicada: U de Mann-Whitney

Variable	Ausente (n=93)		Presente (n=15)		Significancia
	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	
Consumo de tabaco	30	57.7	22	42.3	0.005
Consumo Alcohol	36	65.5	19	34.5	0.254
Ausencia Ejercicio	56	68.3	26	31.7	0.401

Prueba estadística aplicada: Chi cuadrada

Análisis bivariado para la FDNA mayor de 30 para los parámetros seminales y la fertilización.

Regresión logística sin ajuste para inadecuada tasa de fertilización.

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	0.979	0.89	1.07	0.658
IMC (Kg/m ²)	1.015	0.89	1.14	0.820
Consumo Tabaco	2.42	0.77	7.65	0.130
Consumo Alcohol	1.11	0.37	3.33	0.841
Ausencia Ejercicio	5.14	0.64	41.19	0.123
FDNA mayor a 30	2.38	0.78	7.24	0.127

Regresión logística sin ajuste para hipospermia

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	0.96	0.88	1.05	0.418
IMC (Kg/m ²)	1.06	0.95	1.18	0.229
Consumo Tabaco	0.63	0.22	1.78	0.391
Consumo Alcohol	1.25	0.45	3.45	0.667
Ausencia Ejercicio	1.71	0.45	6.47	0.425
FDNA mayor a 30	2.20	0.77	6.22	0.137

Regresión logística sin ajuste para Oligospermia

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	1.05	0.95	1.05	0.288
IMC (Kg/m²)	1.15	1.03	1.31	0.031
Consumo Tabaco	2.13	0.66	6.85	0.202
Consumo Alcohol	0.68	0.22	2.13	0.519
Ausencia Ejercicio	2.05	0.42	9.85	0.367
FDNA mayor a 30	2.76	0.88	8.65	0.082

Regresión logística sin ajuste para teratozoospermia.

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	1.04	0.96	1.14	0.278
IMC (Kg/m ²)	1.08	0.97	1.20	0.159
Consumo Tabaco	3.40	1.11	10.34	0.031
Consumo Alcohol	1.25	0.45	3.45	0.667
Ausencia Ejercicio	0.79	0.25	2.47	0.688
FDNA mayor a 30	3.86	1.35	11.00	0.011

Regresión logística sin ajuste para Astenozoospermia.

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	1.08	0.99	1.17	0.053
IMC (Kg/m ²)	1.05	0.95	1.16	0.334
Consumo Tabaco	1.22	0.49	2.99	0.660
Consumo Alcohol	0.56	0.22	1.39	0.216
Ausencia Ejercicio	1.00	0.35	2.86	0.992
FDNA mayor a 30	5.82	2.22	15.23	<0.001

Regresión logística sin ajuste para Leucospermia.

Variable	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
Edad (años)	1.02	0.93	1.12	0.643
IMC (Kg/m ²)	1.08	0.96	1.20	0.173
Consumo Tabaco	0.93	0.31	2.78	0.902
Consumo Alcohol	0.59	0.19	1.81	0.365
Ausencia Ejercicio	1.31	0.34	5.07	0.692
FDNA mayor a 30	1.71	0.55	5.30	0.347

Concentrado de regresión logística de FDNA para parámetros seminales y tasa de fertilización.

Variable	Desenlace	OR	IC 95% Inferior	Superior	Significancia
FDNA mayor a 30	Hipospermia	2.20	0.77	6.22	0.137
FDNA mayor a 30	Oligospermia	2.76	0.88	8.65	0.082
FDNA mayor a 30	Teratozoospermia	3.86	1.35	11.00	0.011
FDNA mayor a 30	Astenozoospermia	5.82	2.22	15.23	<0.001
FDNA mayor a 30	Leucospermia	1.71	0.55	5.30	0.347
FDNA mayor a 30	Fertilización	2.38	0.78	7.24	0.127

Resultados cuantitativos.

Variables cualitativas

Variable		Frecuencia (n=108)	Porcentaje (%)
Tabaco	Ausente	56	51.9
	Presente	52	48.1
Alcohol	Ausente	53	49.1
	Presente	55	50.9
Ejercicio	Ausente	82	75.9
	Presente	26	24.1

Todas las variables cuantitativas tuvieron una libre distribución, por lo que se deben expresar en mediana como medida de tendencia central y puede ser con rango intercuartilar (25,75) que representa los valores entre los cuales se encuentra el 50% de los valores, o con valores mínimos y máximos.

Variable	Mediana	Mínimo	Máximo
Edad (años)	39.0	23	57
Peso (kg)	80	55	160
Talla (m)	1.71	1.42	1.89
IMC (kg/m ²)	26.75	18.90	51-70
FDNA	24.50	4	83
Volumen (ml)	2	0	8
Concentración (mill/ml)	86.50	1	350
Morfología (%)	12.00	1	98
Mortilidad (%)	48	5	87
Leucospermia (%)	1	0	9

Tasa fertilización (%)	60	0	100
------------------------	----	---	-----

Análisis bivariado. Correlación de Spearman (corresponde este tipo de correlación por la libre distribución de los datos en el análisis descriptivo).

Variable Independiente	Variable Dependiente	Coefficiente de correlación	Significancia
FDNA	Volumen	-.075 (7.5%)	.442
FDNA	Concentración	-.325 (32.5%)	.001
FDNA	Morfología	-.269 (26.9%)	.005
FDNA	Motilidad	-.313 (31.3%)	.001
FDNA	Leucospermia	.087 (8.7%)	.370
FDNA	Ovocitos capturados	-.030 (3%)	.761
FDNA	Fertilizados	-.138 (13.8%)	.154
FDNA	Tasa de fertilización	-.328 (32.8%)	.001

BIBLIOGRAFÍA

1. Oehninger S. Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. *J Androl.* 2000;21:814–21.
2. Lamb DJ, Lipshultz LI. Male infertility: recent advances and a look towards the future. *Curr Opin Urol.* 2000;10:359–62.
3. Speyer BE, Pizzey AR, Abramov B, Saab W, Doshi A, Sarna U, Harper JC, Serhal P. Successful outcomes achieved in assisted reproduction cycles using sperm with high levels of high DNA stainability. *Sys Biol Reprod Med.* 2015;61:293–9.
4. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril.* 2008;90:897–904.
5. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;79:1597–605.
6. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002;23:25–43.
7. Esteves, S. C., Sharma, R. K., Gosálvez, J. & Agarwal, A. A translational medicine appraisal of specialized andrology testing in unexplained male infertility. *Int. Urol. Nephrol.* **46**, 1037–1052 (2014).
8. Majzoub, A., Esteves, S. C., Gosálvez, J. & Agarwal, A. Specialized sperm function tests in varicocele and the future of andrology laboratory. *Asian J. Androl.* **18**, 205–212 (2016).
9. Spano, M. et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team. *Fertil. Steril.* **73**, 43–50 (2000).
10. Giwercman, A. et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int. J. Androl.* **33**, e221–227 (2010).
11. Agarwal, A., Cho, C. L. & Esteves, S. C. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **28**, 164–171 (2016).
12. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil. Steril.* **99**, 673–677 (2013).
13. Simon, L., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A. & Carrell, D. T. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J. Androl.* **19**, 80–90 (2017).

14. Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-Toukhy, T. & Khalaf, Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVFI or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **30**, 120–127 (2015).
15. Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E. & Ciampi, A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* **23**, 2663–2668 (2008).
16. Robinson, L. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* **27**, 2908–2917 (2012).
17. Zhao, J., Zhang, Q., Wang, Y. & Li, Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* **102**, 998–1005 (2014).
18. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;18:1023–8.
19. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 2008;89:823–31.
20. De La Calle JFV, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, Thonneau P. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril.* 2008;90:1792–9.
21. Henkel RR, Franken DR. Sperm DNA fragmentation: origin and impact on human reproduction. *J Reprod Biotech Fertil.* 2011;2:88–108.
22. Zini A, Albert O, Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology.* 2014;2:322–5.
23. Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Franco JG. Association between body mass index and sperm quality and sperm
24. Paul C, Teng S, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod.* 2009;80:913–9.
25. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicol Ind Health.* 2013;29:99–113.
26. Cui X, Jing X, Wu X, Wang Z, Li Q. Potential effect of smoking on semen quality through DNA damage and the downregulation of Chk1 in sperm. *Mol Med Rep.* 2016;14:753–6.
27. Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology.* 2017;5:622–30.
28. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M, Wyrobek AJ. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol.* 2003;518:253–68.

29. Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K, De Angelis P, Claussen O. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039–49.
30. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team. *Fertil Steril*. 2000;73:43–50.
31. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kaspersen KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2003;80:895–902.
32. Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010;12(1):99-103.
33. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23(12):2663-2668.
34. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Guerin JF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87(1): 93-100.
35. Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85(2):371-383.
36. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl* 2007; 28(1):38-49.
37. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1229-1235.
38. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93(4):1027-1036