



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

**Avances en la investigación sobre la Fragmentación del ADN en los
espermatozoides de pacientes normozoospermicos.**

TESIS

Para obtener el título de:

BIOÓLOGA

PRESENTA:

Wendy Annel Gutiérrez Vázquez

TUTOR:

Dra. ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA

Febrero 2022

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
2.1 Espermatogénesis.....	6
2.2 Espermiogenesis:.....	8
2.3 Espermatozoide.....	10
2.4 Semen.....	12
2.5 Valores de referencia.....	12
3. Marco Teórico.....	14
3.1 Origen de la fragmentación del ADN del espermatozoide en humanos.	14
3.2 Empaquetamiento anormal de la cromatina.....	16
3.3 Apoptosis:.....	18
3.4 Estrés oxidativo.....	18
4. Planteamiento del problema.....	19
5. Justificación:.....	21
6. Objetivos:.....	22
6.1 Objetivo General.....	22
6.2 Objetivos específicos.....	22
7. Metodología:.....	23
8. Resultados.....	24
8.1 Causas de la fragmentación del ADN de los espermatozoides.....	25
8.1.1 Empaquetamiento anormal de la cromatina.....	25
8.1.2 Proporciones de protamina 1 y 2.....	26
8.1.3 Apoptosis:.....	27
8.1.4 Especies reactivas de Oxigenos (ROS).....	27
8.1.5 Estrés oxidativo pos testicular.....	28
8.1.6 Factores extrínsecos:.....	28
8.1.6.1 Sobrepeso.....	29
8.1.6.2 Diabetes mellitus.....	29
8.1.6.3 Varicocele.....	30

8.1.6.4 Exceso de glóbulos blancos	30
8.1.6.5 Contaminación ambiental	30
8.1.6.6 Exposición a sustancias químicas ambientales	31
8.1.6.8 Temperatura.....	33
8.6.1.9 Tabaquismo	33
8.1.6.10 La edad.....	34
8.1.6.11 Alcohol	35
8.1.6.12 Quimio / Radioterapia.....	35
8.1.6.13 Medicamentos y vacunas	36
8.1.6.14 Infecciones bacterianas	37
8.1.6.15 Temperatura de los testículos.....	37
8.2 Asociación entre la fragmentación del ADN y la infertilidad masculina:.....	39
8.2 Fragmentación del ADN y correlación con los parámetros seminales	39
8.3 Impacto de la fragmentación del ADN espermático en el embarazo y las Técnicas de reproducción asistida	41
8.3.1 Técnicas de reproducción asistida (TRA).....	41
8.3.2 Fragmentación y embarazo	42
8.4 Técnicas utilizadas para determinar la fragmentación en espermatozoides humanos:.....	43
8.4.1 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferasemediated dUDP nick-end labelling assay).	47
8.4.2 Ensayo Cometa.....	47
8.4.3 Fluoróforo metacromático naranja de acridina (AO).	49
8.4.4 Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA).	49
8.4.5 Prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD).....	50
8.4.6 Análisis de in situ nick translation (ISNT)	50
8.4.7 DBD-FISH.....	51
9. DISCUSION:.....	52
10. CONCLUSION	58
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA.....	59

1. Resumen

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación continua de las células germinativas para producir espermatozoides maduros. No obstante durante la etapa de espermatogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático provocando infertilidad en el varón y el desarrollo del embrión puede verse comprometido. Existen estudios para evaluar la infertilidad masculina, para ello, la OMS estableció una serie de parámetros básicos en el semen, sin embargo, se estima que alrededor del 15% de los hombres infértiles son pacientes con parámetros seminales normales (normozoospermicos). El objetivo de este trabajo fue investigar en la literatura científica las causas que inducen la fragmentación del ADN en individuos con diagnóstico de normozoospermia y sus consecuencias en la salud reproductiva. Se realizó una búsqueda bibliográfica en las base de datos: EBSCO, Cambridge University Press, Pubmed, Pubmed Central, Science, Science Direct, con las palabras clave: *Sperm DNA fragmentation, human sperm fragmentation, Sperm DNA fragmentation causes*. Según la bibliografía el daño al ADN del espermatozoide puede ser inducido por las siguientes causas: Estrés oxidativo, apoptosis, Empaquetamiento anormal de la cromatina, Varicocele, Exceso de glóbulos blancos, contaminación ambiental, sobrepeso, Diabetes mellitus, Tabaquismo, drogas, alcohol, quimioterapia, radioterapia, edad avanzada, calor, Infecciones bacterianas. Las técnicas de reproducción asistida se ven comprometidas dependiendo de los altos niveles de fragmentación del ADN de los espermatozoides (DFI) ($\geq 30\%$) se han asociado con un mal resultado del proceso de fertilización y por ende en el logro de un embarazo tanto natural como in vitro. Las pruebas de Fragmentación de ADN espermático son un indicador más preciso del estado de fertilidad masculina, ya que analiza el genoma paterno. Debido al incremento en el número de parejas con infertilidad se hace necesario realizar las pruebas de Fragmentación del ADN del espermatozoide humano ya que el análisis seminal no determina la calidad del ADN de los espermatozoides.

Palabras clave: *Espermatogénesis, Fragmentación del ADN, normozoospermia, infertilidad, espermatozoide.*

Avances en la investigación sobre la Fragmentación del ADN en los espermatozoides de pacientes normozoospermicos.

2. Introducción

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación continua de las células germinativas para producir espermatozoides (Molina, 2015). La espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos, a partir de las espermatogonias que presentan divisiones celulares y modificaciones morfológicas para dar lugar a los espermatozoides maduros. Este proceso inicia en la pubertad y continúa durante toda la vida adulta del hombre (Hoffman et al., 2020).

Las espermatogonias son células madre que permiten la producción constante de células germinativas durante la vida del varón. En el varón fértil, diariamente se producen en los túbulos seminíferos, entre 100 y 200 millones de espermatozoides (Sigman & Jarow, 1997).

Los testículos poseen dos funciones: la generación de células germinativas maduras (espermatozoides) y la producción de hormonas masculinas, principalmente testosterona (Molina, 2015).

Durante la etapa embrionaria, en los testículos se forman los lobulillos testiculares y en su interior se pueden observar unas largas estructuras filiformes, carentes de luz interior, que reciben el nombre de cordones seminíferos. Estos cordones están compuestos por células incluidas en tejido conectivo y van a continuar así durante el resto de la vida prenatal y la infancia. (Matínez et al, 2017)

Cuando llega la pubertad, los cordones seminíferos se transforman en **túbulos seminíferos** al formarse una luz interna a lo largo de ellos, quedando las células en la periferia de los túbulos, rodeadas de una lámina basal. Alrededor de los túbulos seminíferos se encuentra un tejido conectivo en el que se incluyen vasos sanguíneos y unas pequeñas células denominadas células intersticiales o células de Leyding que producen hormonas esteroides (Paniagua et al., 2017). Las células del interior de los túbulos seminíferos quedan dispuestas en capas y compartimentos y en conjunto reciben el nombre de epitelio seminífero; existen dos

linajes celulares diferentes en el epitelio seminífero: las células de Sertoli y las células espermatogénicas(Figura 1) (Panamericana, 2017).

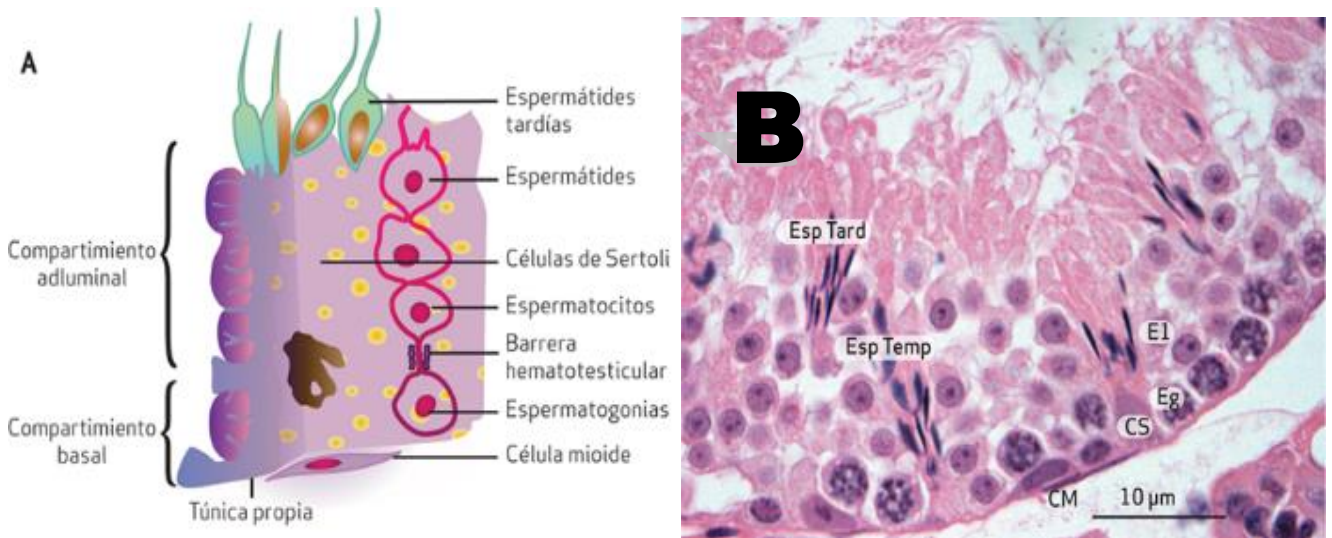


Figura 1. A) Esquema del epitelio seminífero mostrando la asociación de las células de Sertoli con las células espermatogénicas. **B)** En el epitelio seminífero están presentes las células de Sertoli (CS), así como las células espermatogénicas. En el compartimiento basal se encuentran las espermatogonias (Eg) y en el compartimiento adluminal se observan espermatocitos primarios (E1), espermatídes tempranas (Esp Temp) y espermatídes tardías (Esp Tard). Note cómo las espermatídes tardías están en estrecha asociación con el citoplasma de las células de Sertoli. Células mioides (CM). Tinción H-E.(Bizarro Nevaes et al., 2017).

Las células de Sertoli o células de sustentación tienen uniones firmes entre ellas y forman una barrera hematotesticular; ese espacio avascular dentro de los túbulos seminíferos protege a los espermatozoides de los anticuerpos y toxinas, pero también provoca que las células dependan de la difusión proveniente de las células de Sertoli para obtener oxígeno, nutrientes y precursores metabólicos. Dichas células sustentaculares van a tener una importante función, ya que van a actuar como “nodrizas” de las células espermatogénicas que les permitirán a estas últimas alcanzar la madurez necesaria para ir transformándose paulatinamente en espermatozoides (Hoffman et al., 2020).

2.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende dos etapas: 1) la espermatocitogénesis, que corresponde a la diferenciación de las espermatogonias hasta las espermatídes;

esta etapa incluye varias divisiones mitóticas y las dos divisiones meióticas y 2) la espermiogénesis se refiere a la transformación de las espermatídes hasta los espermatozoides y no incluye divisiones celulares (Bizarro Nevares et al., 2017)

1.- En la espermatocitogénesis, las células espermatogénicas más primitivas reciben el nombre de espermatogonias primitivas o células madre espermatogénicas, las cuales tienen una dotación cromosómica diploide ($2n$) y están situadas en la porción más periférica de los túbulos seminíferos pegadas a la membrana basal, a partir de ese momento algunas espermatogonias permanecen en reposo mientras que otras comienzan a proliferar por mitosis (Serna, 2015)

En el ser humano se reconocen tres tipos de espermatogonias; las espermatogonias de tipo A oscuras ($2n$) son las células más indiferenciadas de las células espermatogénicas, tienen un núcleo ovoide notablemente basófilo y granular; se dividen por mitosis dando lugar a células de su mismo tipo y a espermatogonias de tipo A claras ($2n$). Las espermatogonias de tipo A claras son muy semejantes a las de tipo A oscuro, excepto que el núcleo es menos basófilo, estas células al dividirse por mitosis dan lugar a las espermatogonias de tipo B. Las espermatogonias tipo B aumentan de tamaño presentan un núcleo esférico con heterocromatina en el margen y rodeando al nucléolo. Al dividirse por mitosis, las espermatogonias de tipo B dan origen a los espermatocitos primarios diploides $2n$ y con fórmula cromosómica $46xy$. Estos espermatocitos primarios son células más voluminosas y representan la última generación de espermatogonias que se originan por mitosis (Figura 2) (Serna, 2015).

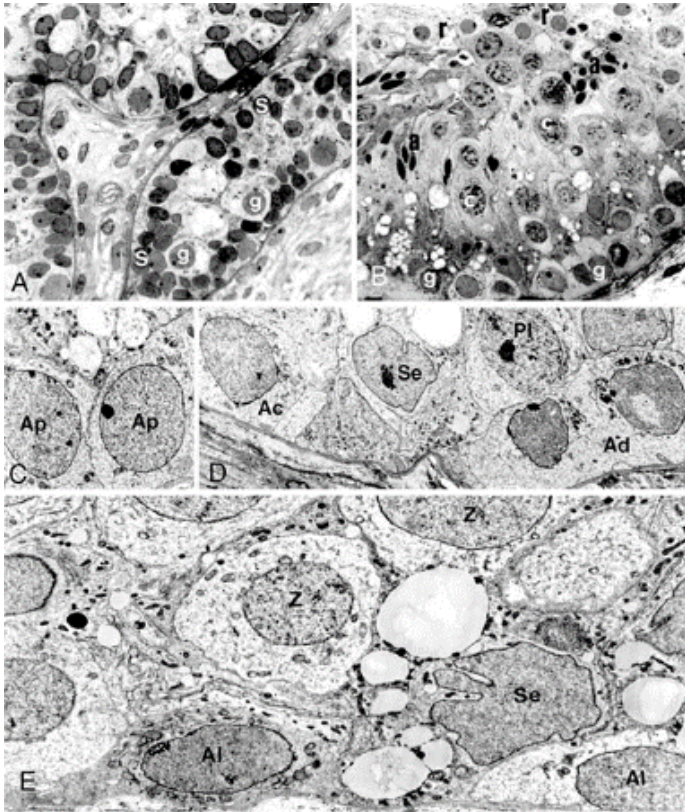


Figura 2. **A:** Testículo infantil. Los túbulos seminíferos contienen sólo células de Sertoli (S) y espermatogonias o gonocitos (g). $\times 450$. **B:** Testículo de varón adulto con espermatogénesis completa que muestra: espermatogonias (g), espermatocitos primarios (c), espermatídas redondas (r) y espermatídas alargadas (a). $\times 450$. **C- D:** Diversos tipos de espermatogonias A en testículo humano. En la figura D se aprecian también espermatocitos en preleptoteno (Pl) y células de Sertoli (Se). $\times 2600$. **E:** Parte del epitelio seminífero humano que muestra espermatogonias alargadas (Al), espermatocitos en cigoteno (Z) y una célula de Sertoli (Se). $\times 4000$. Ap, espermatogonias pálidas; Ad: espermatogonias oscuras; Ac, espermatogonias intermedias (Paniagua et al., 2017).

Los espermatocitos primarios entran nuevamente en división pero ahora a la primera meiosis y dan origen a los espermatocitos secundarios. Estos últimos, son haploides y con cromosomas bivalentes, uno de los espermatocitos secundarios va a tener fórmula cromosómica $23X$ y otro $23Y$, éstos últimos, al presentar la segunda división meiótica, dan lugar a las espermatídes. Es importante mencionar que en las divisiones celulares, tanto mitosis como meiosis, no ocurre la citocinesis total, lo que deja puentes citoplasmáticos que permiten la formación de sincicios para un desarrollo sincronizado de las células espermatogénicas, las cuales garantizan una producción constante de espermatozoides (Bizarro Nevares et al., 2017)

2.2 Espermiogenesis:

Cada una de las espermatidas entran en un proceso de diferenciación denominado espermiogenesis, durante el cual van a sufrir una serie de cambios que la transforma en un espermatozoide haploide con una morfología característica. Las espermatídes y los espermatozoides son células espermatogénicas que quedan

situadas más al interior de los túbulos seminíferos (cerca de la luz) (Panamericana, 2017).

Durante la espermiogénesis, las espermatídes van a experimentar los siguientes cambios (Hoffman et al., 2020) (Figura 3).

- a) Liberación el exceso de citoplasma (que será fagocitado por las células de Sertoli)
- b) La cromatina se compacta (reduciendo el tamaño del núcleo)
- c) El retículo de Golgi se fusiona y forma el acrosoma (que recubre la mayor parte del núcleo)
- d) El centriolo distal va a dar origen al flagelo del espermatozoide (que dará la motilidad propia a estas células)
- e) Las mitocondrias se concentran alrededor del cuello del espermatozoide formando la vaina mitocondrial (que dará la energía necesaria al espermatozoide para su motilidad).
- f) El citoplasma forma una vaina alrededor del cuello y el flagelo del espermatozoide y que se le denomina gota citoplasmática.

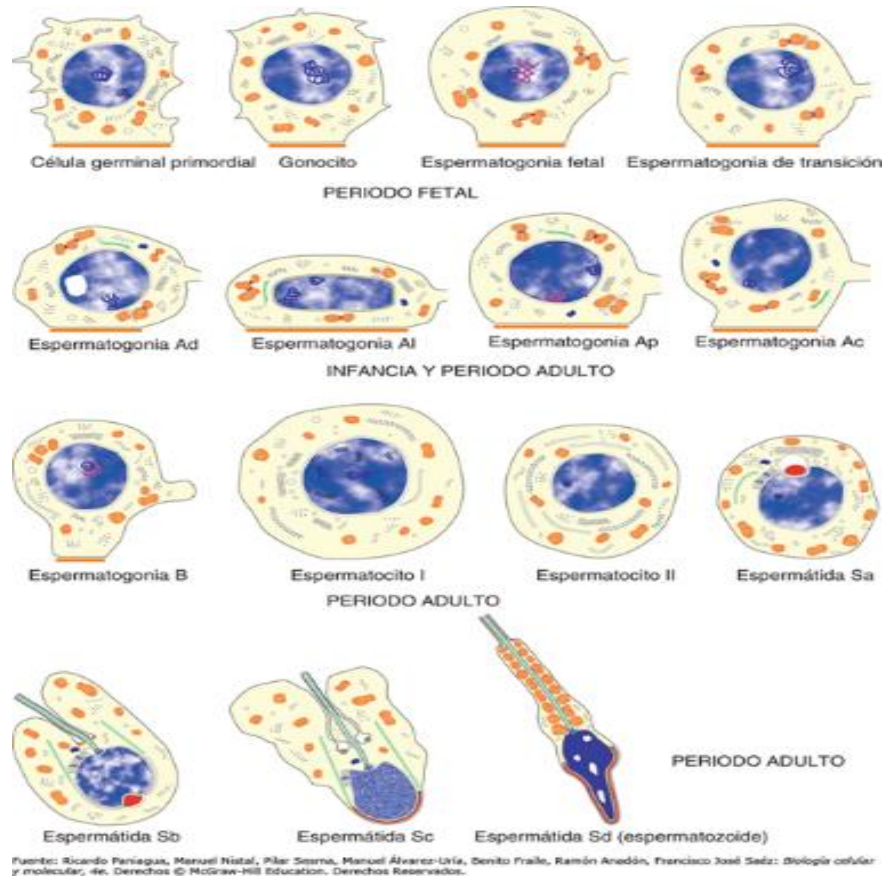


Figura 3. Desarrollo de las células germinales desde la célula germinal primordial hasta el espermatozoide (Paniagua et al., 2017).

2.3 Espermatozoide.

El resultado final es la obtención de espermatozoides maduros. El espermatozoide es la célula de mamífero más diferenciada, mide 60 μm de largo; está formado por la cabeza y la cola. La cabeza es aplanada y mide 4.5 μm de largo y 3 μm de ancho; está formada por el núcleo y el acrosoma. La cola tiene cuatro regiones: cuello, pieza intermedia y pieza principal. (Bizarro Nevares et al., 2017)

El cuello es un estrechamiento que sigue a la cabeza y da origen al flagelo, este es corto y está formado por los centriolos y es el inicio de las fibras densas que forman el flagelo del espermatozoide.

La pieza intermedia que se extiende unos 5 μm . Es el extremo proximal del flagelo y contiene el axonema y un par central de microtúbulos. Estas fibras no son simétricas respecto a un eje, sino respecto al plano que divide la fibra 1 en dos

partes y pasa entre las fibras 5 y 6. Las fibras 1, 5 y 6 son más gruesas que las demás. Externamente a las fibras densas se encuentra la vaina mitocondrial, constituida por mitocondrias alargadas, de crestas paralelas y matriz moderadamente densa, dispuestas formando una doble hélice. Hay escaso citoplasma entre la vaina mitocondrial y la membrana plasmática que la limita externamente (Figura 3).

La pieza principal sigue a la pieza intermedia y es la parte más larga del flagelo ($\approx 45 \mu\text{m}$). En ella, la vaina mitocondrial ha sido sustituida por la vaina fibrosa. La configuración de las fibras densas varía de la pieza intermedia a la pieza principal. A medida que avanzan hacia el extremo caudal del flagelo, las fibras densas son más finas. (Bizarro Nevares et al., 2017)

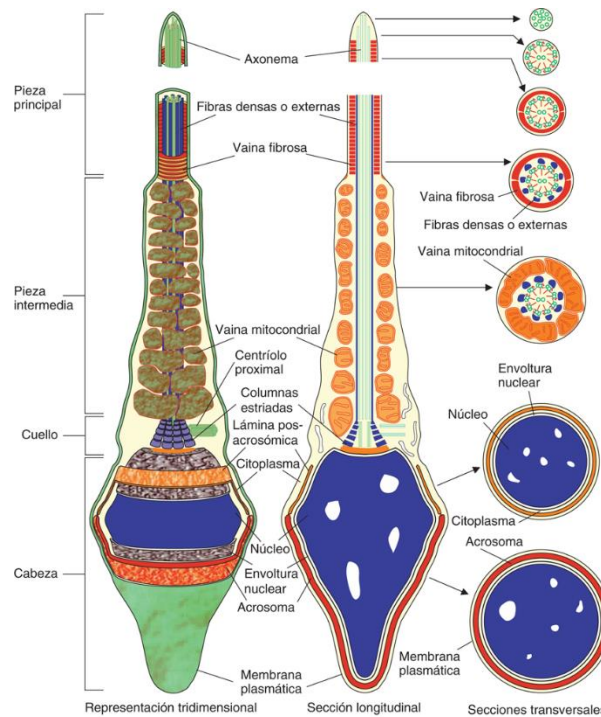


Figura 4. Estructura del espermatozoide humano (Paniagua et al., 2017).

El objetivo principal de los espermatozoides consiste en transferir ADN haploide masculino al ADN femenino en el citoplasma de un ovocito a través de una serie de

eventos que implican su desplazamiento a lo largo del tracto genital femenino y su capacidad de fecundar al ovocito (Paniagua et al., 2017).

2.4 Semen

El líquido que se eyacula al momento del orgasmo en los varones es el semen; este líquido contiene a los espermatozoides y a las secreciones de las vesículas seminales, de la próstata, de las glándulas de Cowper y probablemente, de las glándulas uretrales. El volumen promedio por eyaculación es de 1.5 mL después de algunos días de abstinencia sexual. El volumen del semen y el conteo de espermatozoides disminuyen rápidamente con la eyaculación repetida. Aunque solo se necesita un espermatozoide para fertilizar el óvulo, cada mililitro de semen contiene normalmente unos 100 millones de espermatozoides (Barrett et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido los valores normales de los parámetros en el semen humano (Tabla 1 y 2), la reducción en la producción de espermatozoides ($<15 \times 10^6$ células por mL), la presencia de espermatozoides con alteraciones morfológicas ($<4\%$ normales) o de espermatozoides inmóviles ($\geq 40\%$ móviles) también se correlaciona con la infertilidad. Además, en el semen hay altas concentraciones de prostaglandinas que provienen de las vesículas seminales, pero aún se desconoce su función en el semen (Walsh & Smith, 2015). Las causas de la infertilidad masculina, así como los mecanismos subyacentes de los espermatozoides en la fertilización, se utilizan como base en el desarrollo de la anticoncepción masculina (Bizarro Nevares et al., 2017).

2.5 Valores de referencia

“El objetivo del análisis de semen básico es evaluar los parámetros descriptivos de eyaculados obtenidos mediante masturbación. Las cualidades macroscópicas que se evalúan son el aspecto visual, olor, licuefacción, viscosidad, volumen y las microscópicas son concentración espermática por mL y número total de espermatozoides, movilidad y vitalidad espermática. Además, también se realiza el recuento diferencial según la morfología espermática, la estimación de la aglutinación/agregación, y la evaluación de la presencia de detritus y otros tipos celulares en semen (Heineman, 2004).

En las Tablas 1 y 2 se muestran los valores de referencia y terminología para el diagnóstico de un análisis de semen de acuerdo al Manual de Laboratorio para la Exanimación y Procesamiento del semen humano de la OMS del 2010.

VARIABLES MACROSCÓPICAS	LIMITES DE REFERENCIA
Volumen	≥1.5 ml
Color	Grisáceo a ligeramente amarillento
Coagulo	Presente
Licuefacción	60 minutos
Viscosidad	Normal
Ph	7.2-8.0

Tabla 1. Valores de referencia las variables macroscópicas del análisis del semen humano (OMS 2010).

VARIABLES MICROSCÓPICOS	LIMITES DE REFERENCIA
Concentración.	15 x 10 ⁶ espermatozoides/ml
Cuenta total.	>39 x 10 ⁶ espermatozoides.
Motilidad total (Progresivos y no progresivos)	≥40%
Motilidad progresiva	≥32 %
Viabilidad	≥58% vivos
Morfología	≥4%
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /ml
Otros Tipos Celulares	Valores Normales
Células inmaduras	< 5 por campo
Bacterias	Escasas
Agglutinación.	< 10%

Tabla 2. Valores de referencia de las variables microscópicas del análisis de semen humano (OMS 2010).

3. Marco Teórico

3.1 Origen de la fragmentación del ADN del espermatozoide en humanos.

La idea de que la medición de la fragmentación del ADN de los espermatozoides podría ser una prueba útil de la fertilidad masculina se remonta a la década de 1940 (Pacey, 2018). En 1946, Pollister y Mirsky descubrieron que una gran parte de los complejos de proteínas que rodean el ADN en los espermatozoides de trucha no estaban compuestos de histonas sino de protaminas (Pollister & Mirsky, 1946). Poco después en 1949 con las investigaciones de Hans y Mirsky, observaron que “la estructura de los cromosomas cambiaba por eventos espontáneos o en condiciones experimentales (rayos X, etc.) que causaban roturas (fragmentación) de los mismos (Hans, 1948). Más tarde, Alfert, en 1956 descubrió que las protaminas reemplazan a las histonas después de la meiosis en la maduración de los espermatozoides del salmón. Junto con el descubrimiento de la doble hélice en 1953, Leuchtenberger y colaboradores (1953) descubrieron que la cantidad de ADN de los machos infértiles tenía una variación significativamente mayor en comparación con los machos fértiles.

Con estas investigaciones ayudaron a descubrir en el camino de la ciencia, que la calidad de una muestra de espermatozoides era más que una cuestión de número y movilidad de los espermatozoides (Leuchtenberger et al., 1953).

Durante los años setenta, surgió un interés creciente en una posible asociación entre la exposición a agentes que dañan el ADN y una posible reducción de la fertilidad. En (1970) Ringertz y colaboradores utilizaron un ensayo en el que se calentaron espermatozoides de toro a 100°C y se detectó la posterior desnaturalización del ADN por microfluorimetría, al usar naranja de acridina. Se dieron cuenta de que los espermatozoides presentaban una mayor estabilidad durante la espermiogénesis (Ringertz et al., 1970). En otro estudio observaron una disminución en el recuento de espermatozoides del epidídimo y el peso de los testículos en ratones después de la exposición a la irradiación. Posteriormente, se observó una mayor pérdida de preimplantación de embriones en los ratones hembra

después del apareamiento (Searle & Beechey, 1974). Por otro lado Williamson en el mismo año aisló ADN de hepatocitos de embrión de ratón. En su trabajo, observo que el ADN aislado presentaba diferentes grados de absorción, esta diferencia es común entre el ADN del citoplasma y el ADN nuclear. Por lo tanto, formulo la hipótesis de que los fragmentos de ADN citoplasmáticos correspondían a una degradación específica de ADN nuclear asociada a muerte celular o apoptosis. A partir de este momento, quedó claro que había diferencias medibles entre la cantidad o composición de ADN de diferentes individuos o poblaciones de sujetos animales o humanos con fertilidad alta o baja (Williamson, 1970).

Durante la etapa de espermatogénesis se puede producir un daño en el ADN espermático. Se han estudiado factores etiológicos, que provocan daño irreversible en el ADN del gameto masculino, que se han correlacionado con altos niveles de daño en el ADN de los espermatozoides del varón (Spanò et al., 2000)

Durante la espermatogénesis se realiza un proceso único de remodelación de cromatina. En el esperma la cromatina tiene actividad transcripcional reprimida y el ADN se encuentra condensado. Para que se lleve a cabo el proceso de compactación de cromatina primero, se requiere la participación de las histonas, estas son proteínas nucleares básicas responsables del empaquetamiento del ADN en las células somáticas. Cuando las histonas están hiperacetiladas y los nucleosomas se disocian (Aoki et al., 2005) (Carrell et al., 2007), el ADN sufre remodelación, ya que las proteínas son reemplazadas, por proteínas de transición (TP1, TP2 y TP4). Estas proteínas de transición aparecen en un breve periodo de 2 a 3 días durante las etapas 12-15 de la espermiogénesis y son extremadamente importantes durante la condensación normal del ADN, porque reducen las roturas del ADN. Al final de la espermiogénesis, las proteínas de transcripción (TP) se reemplazan por nucleoproteínas específicas llamadas protaminas (PRM) (Pradeepa & Rao, 2007).

Las protaminas tienen la función de compactar el ADN del esperma de tal manera que es seis veces más compacto que el ADN de las células somáticas y promueve la estabilización y protección del núcleo del esperma (McLay y Clarke, 2003).

Además, la compactación del ADN disminuye el volumen celular del espermatozoide, facilitando su paso a través del tracto reproductor femenino, la penetración y activación del ovocito, que posteriormente iniciará el desarrollo embrionario sin dañar el ADN (Oliva, 2006).

Las PRM se unen a la curvatura menor del ADN y forman complejos altamente compactados. Cuando las protaminas se unen al ADN, hacen que las partículas de ADN se enrolen en círculos concéntricos y forma una estructura denominada toroide que lo condensa (Wouters-Tyrou et al ., 1998) y promueve una mayor estabilidad del ADN (Gosálvez et al ., 2011). Las estructuras toroides de las nucleoproteínas contienen ADN altamente compactado y ubica ligandos en cada curvatura del ADN que lo mantiene unido. En la figura 5 se muestra un esquema de los cambios en la cromatina de los espermatozoides.

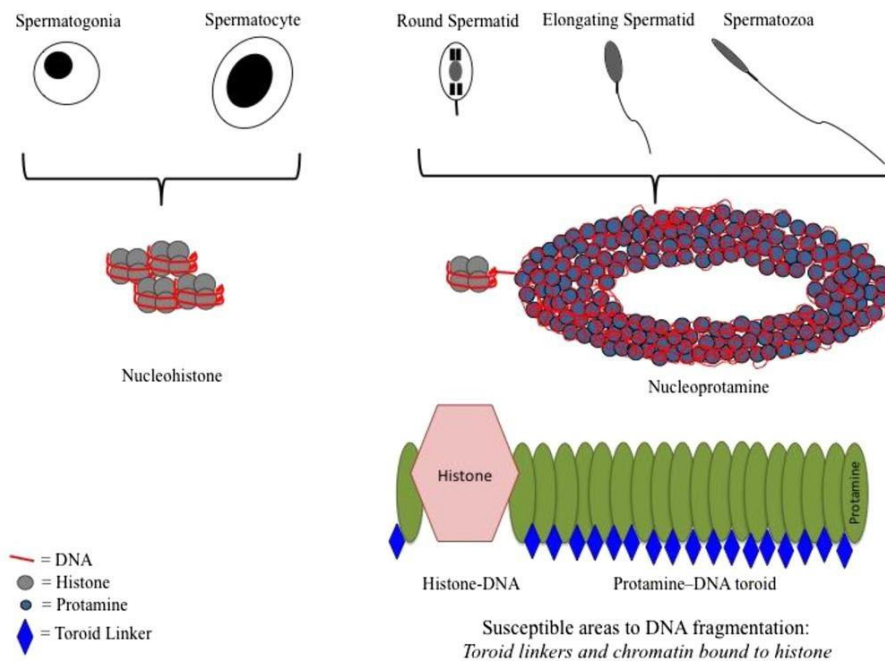


Figura 5. Representación esquemática de los cambios de cromatina durante la espermiogénesis y las regiones susceptibles de la cromatina de los espermatozoides a la fragmentación del ADN.(Hamilton & Assumpção, 2020)

3.2 Empaquetamiento anormal de la cromatina

El intercambio que ocurre entre las histonas y las proteínas que se encuentran en las estructuras toroides de los espermatozoides, se debe a que en las espermátidas,

el ADN debe sufrir una serie de roturas programadas y reparaciones posteriores. Se cree que en este proceso la topoisomerasa II es imprescindible. Esta enzima es la responsable de cortar y reunir correctamente el ADN para reducir el estrés torsional originado. Si hay algún tipo de alteración en el control de este proceso, pueden existir roturas en el ADN que no sean reparadas y que persistan en los espermatozoides (Hamilton & Assumpção, 2020).

Así mismo, la topoisomerasa es importante en el proceso debido a que promueve la condensación del ADN mediante la ruptura fisiológica y la unión del ADN durante la espermiogénesis. Las rupturas fisiológicas que se presentan en el ADN de los espermatozoides durante la espermiogénesis alivian la torsión de la cromatina, lo que favorece el proceso de protaminación. No obstante estas roturas endógenas del ADN no deben persistir en los espermatozoides maduros (McPherson y Longo, 1993) y deben ser reparadas por la propia célula antes de que finalice el proceso de protaminación (Balhorn, 1982 ; Andrabi, 2007), de lo contrario esto puede causar que el ADN se presente fragmentado. En el estudio de Zhao y colaboradores (2004) demostraron que los ratones que carecen de proteínas de transición generan espermatozoides con altos niveles de fragmentación en el ADN, una compactación defectuosa de cromatina y un bajo potencial de fecundación. No obstante, las células en etapas avanzadas de diferenciación (espermátidas y espermatozoides) las roturas del ADN no son detectables y no tienen ningún mecanismo de reparación, por lo que podrían estar presentes en el eyaculado células con daño en el ADN (Lewis y Agbaje, 2008).

Los espermatozoides con daño en el ADN pueden fertilizar, pero el desarrollo del embrión puede verse comprometido (Tesarik et al ., 2002). El efecto de la cromatina espermática anormal depende de la capacidad del ovocito para reparar el daño del ADN (Evenson et al ., 2002 a). Los ovocitos y embriones en una etapa temprana de desarrollo son capaces de reparar el daño del ADN de los espermatozoides, pero esta capacidad es limitada y no se resuelven problemas como DSB y roturas en regiones asociadas a histonas (Menezo et al ., 2010). Por lo tanto, la integridad del ADN de los espermatozoides es un rasgo importante e independiente de los

espermatozoides que se ha asociado con el potencial de fertilidad en las biotecnologías reproductivas (Larson-Cook et al ., 2003).

3.3 Apoptosis:

La fragmentación del ADN espermático también puede ser inducida por apoptosis abortiva durante la espermatogénesis. La apoptosis asegura que ninguna célula germinal defectuosa se diferencie en espermatozoides; sin embargo, el fracaso de este proceso puede resultar en la acumulación de espermatozoides que expresan marcadores apoptóticos FAS que se unen a receptores de muerte y que activan la caspasa-8 o 10 en el semen eyaculado. De hecho, la expresión de Fas en los espermatozoides eyaculados es un indicador de un aumento de la apoptosis abortiva. Fas se ha implicado en el control de la apoptosis durante la espermatogénesis en varias especies de mamíferos. En el ser humano, la presencia de daño en el ADN nuclear en los espermatozoides eyaculados ha apuntado a un posible papel de la apoptosis durante la espermatogénesis (Boekelheide, 2005). Además, la presencia de Fas y p53 en el espermatozoide de hombres infértiles indica que estas células podrían haber escapado del proceso apoptótico abortivo (Sakkas et al ., 2002).

3.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes en el plasma seminal. Las ROS son moléculas derivadas del oxígeno altamente reactivas con uno o más electrones libres (Sanocka & Kurpisz, 2004). En el equilibrio correcto, las ROS juegan un papel importante en los espermatozoides: contribuyen a la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión entre espermatozoide-ovocitos (Aitken, 2017). El desequilibrio patológico puede ser causado por múltiples factores: producción excesiva de ROS endógenas (son la radiación, la inflamación, la activación de oxidasas y oxigenasas y la pérdida de la capacidad antioxidante) o exógenas (la fosforilación oxidativa, los peroxisomas y la activación de células inflamatorias(Bisht et al., 2017) suministro agotado de antioxidantes, inactivación o disminución de la producción de enzimas antioxidantes o una combinación de los mencionados(Evans

et al., 2021). Este tipo de reacción genera daño al menos en una de las cadenas de ADN, induciendo la fragmentación del ADN de los espermatozoides (Agarwal et al., 2003).

4. Planteamiento del problema

La infertilidad masculina es un problema global que representa el 50% de todos los casos (Selvam et al., 2019). La evaluación de la infertilidad masculina en el laboratorio comienza con el análisis de semen convencional, que incluye parámetros espermáticos clave como concentración, motilidad, morfología y viabilidad. Los parámetros anormales del semen se consideran un indicador de subfertilidad en los hombres (Sharlip et al., 2002).

Se han estudiado etiologías para comprender las posibles causas de infertilidad masculina, sin embargo, hasta un 30% de los hombres con parámetros seminales normales (normozoospermicos) son diagnosticados con infertilidad Idiopática (UMI) ya que se desconoce el motivo de su infertilidad (Selvam et al., 2019).

El fracaso de la fertilización de los espermatozoides no se explica claramente con el análisis de semen convencional, pocos estudios examinan específicamente el daño del ADN espermático en hombres normozoospermicos que se presentan para un estudio de infertilidad (Belloc et al., 2014).

Además se han encontrado números estudios que demuestran que el aumento de la Fragmentación del ADN espermático afecta negativamente a las tasas de concepción. Debido a que el daño del ADN en los espermatozoides puede afectar la salud y el bienestar de la descendencia e infertilidad masculina. De acuerdo con un estudio de Eisenberg et al (2017) los hombres que presentaban un diagnóstico normozoospermico experimentaron abortos espontáneos recurrentes inexplicables debido a que tuvieron un alto porcentaje de daño en el ADN del espermatozoide.

Tomando en cuenta que un cambio en la expresión de las proteínas del espermatozoide puede ser una causa importante de subfertilidad en hombres normozoospermicos, es necesario contar con pruebas específicas para evaluar la integridad del ADN

espermático ya que la fragmentación del ADN de los espermatozoides puede causar esterilidad masculina (Pradeepa & Rao, 2007).

Además se han encontrado números estudios que demuestran que el aumento de la Fragmentación del ADN espermático afecta negativamente a las tasas de concepción. Debido a que el daño del ADN en los espermatozoides puede afectar la salud y el bienestar de la descendencia e infertilidad masculina. De acuerdo con un estudio de Eisenberg et al., (2017) los hombres que presentaban un diagnóstico normozoospermico experimentaron abortos espontáneos recurrentes inexplicables debido a que tuvieron un alto porcentaje de daño en el ADN del esperma.

5. Justificación:

La integridad del ADN del espermatozoide es importante para la transmisión del código genético del gameto masculino y es decisiva para un embarazo sano y exitoso (Benchabib et al., 2003). Existen estudios para evaluar la infertilidad masculina, para ello, la OMS estableció una serie de parámetros básicos en el semen humano que deben ser analizados de forma rutinaria, tales como: volumen de eyaculación, concentración de espermatozoides, vitalidad, morfología y pH. Sin embargo, se estima que alrededor del 15% de los hombres infértiles son pacientes normozoospermicos es decir presentan valores de semen normales.

Los eyaculados del varón pueden presentar altos porcentajes de espermatozoides con fragmentación del ADN, lo que presenta una amenaza para la fertilidad masculina y la salud de la descendencia. Esto significa un problema, ya que existe un grupo de hombres con problemas reproductivos que presentan características de concentración, motilidad y morfología normales, pero con altos niveles de fragmentación del ADN espermático, por lo que se puede inferir que muchos parámetros del semen no representan completamente la calidad del espermatozoide.

Como se ha comprobado que la integridad del ADN es fundamental para la fecundación, implantación y desarrollo de los embriones debido a que los altos niveles de fragmentación del ADN de los espermatozoides (DFI) se ha asociado significativamente con una falla del embarazo. Por esta razón es importante conocer el grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides con diagnóstico de normozoospermia, debido a los múltiples factores que están causando fragmentación nuclear como, el empaquetamiento anormal de la cromatina provocando errores en la sustitución de histonas por protaminas, la apoptosis y una sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno induce la SDF.

6. Objetivos:

6.1 Objetivo General

Investigar en la literatura científica las causas que inducen la fragmentación del ADN en individuos con diagnóstico de normozoopermia y sus consecuencias en la salud reproductiva.

6.2 Objetivos específicos.

1. Investigar las causas más frecuentes que inducen la fragmentación del ADN de pacientes normozoospermicos.
2. Investigar si la fragmentación del ADN del espermatozoide es causa importante de infertilidad en la pareja.
3. Documentar el efecto de la fragmentación del ADN espermático en las técnicas de reproducción asistida.
4. Contrastar si se ha registrado un aumento en la fragmentación del ADN en los últimos años.
5. Investigar las técnicas utilizadas para la determinación de la fragmentación.

7. Metodología:

La búsqueda bibliográfica se realizó en las base de datos: EBSCO, Cambridge University Press, Pubmed, Pubmed Central, Science, Science Direct, con las palabras clave: *Sperm DNA fragmentation, human sperm fragmentation, Sperm DNA fragmentation causes*. No hubo restricción por fecha de publicación de los artículos debido a la importancia de conocer la evolución de las causas más frecuentes por las que se da la fragmentación del ADN en pacientes normozoospermicos, sin embargo para hacer la selección de artículos, se realizó una división de artículos. Primero se investigó en qué año se empezó a estudiar la fragmentación del ADN espermático y cuál fue la causa que lo originó en los pacientes normozoospermicos, estos artículos con fechas de publicación de 1940 hasta 2005 se utilizaron para redactar antecedentes, a partir del año 2009 hasta el 2021 se seleccionaron los artículos que reportaran sobre las pruebas que se han realizado para la determinación de la fragmentación del ADN y si la fragmentación del ADN del espermatozoide es causa de infertilidad en la pareja, dando importancia a los artículos de fechas recientes para investigar si ha aumentado el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en pacientes normozoospermicos.

Además se investigó cuáles eran los valores normales de la fragmentación del ADN de los espermatozoides que podemos encontrar en pacientes normozoospermicos.

Criterios de selección: Artículos escritos en español o inglés; causas en la fragmentación del ADN espermático, casos clínicos en el que los pacientes eran diagnosticados como normozoospermicos; aplicación de los estudios o pruebas en humanos.

Se dio preferencia a los estudios que aportaron información sobre la repercusión de la fragmentación del ADN espermático en el proceso de la fertilización y que afecta negativamente las tasas de concepción, el proceso de desarrollo embrionario y en la salud y el bienestar de la descendencia.

Se incluyó, además, una breve revisión de las técnicas actuales para evaluar la fragmentación del ADN, su utilidad con sus respectivas ventajas y desventajas. Por

último se hace una serie de recomendaciones de práctica clínica con base en lo que se considera el mejor abordaje en este tema.

8. Resultados

Las palabras clave como *Sperm DNA fragmentation*, *Human sperm fragmentation*, *Sperm DNA fragmentation causes*, resultaron en más de 19444, 77038 y 75710 artículos respectivamente en el buscador “Cambridge Core”, en la cual se registró un número mayor de publicaciones en comparación de los otros buscadores (Tabla 3). Se llevó a cabo una exhaustiva selección de los artículos con base en los criterios señalados y, sobre todo su aplicación en humanos.

Buscador	Número de artículos encontrados	Palabras clave
EBESCO	8, 462	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	3,774	<i>human sperm fragmentation</i>
	367	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Cambridge Core	19,444	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	77,038	<i>human sperm fragmentation</i>
	75,710	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Pubmed	2,945	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	2,997	<i>human sperm fragmentation</i>
	1,307	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Pubmed Central	10,481	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	11,557	<i>human sperm fragmentation</i>
	7,954	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Scients	694	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	716	<i>human sperm fragmentation</i>
	464	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Science direct	10,078	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	10,402	<i>human sperm fragmentation</i>
	7,594	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>

Nature	894	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	877	<i>human sperm fragmentation</i>
	389	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>
Springer	5,662	<i>Sperm DNA fragmentation</i>
	6,662	<i>human sperm fragmentation</i>
	4,704	<i>Sperm DNA fragmentation causes</i>

Tabla 3: Registró del número de artículos encontrados en cada buscador vs palabras clave.

8.1 Causas de la fragmentación del ADN de los espermatozoides

Según la bibliografía el daño al ADN del espermatozoide puede afectar al ADN mitocondrial como al nuclear y se ha demostrado que estos pueden ocurrir durante la producción o el transporte de las células espermáticas a través de los túbulos seminífero y el epidídimo, el cual afecta el potencial de fertilidad masculina (Quintero–Vásquez et al., 2015)

Este daño puede ser inducido por los siguientes mecanismos:

8.1.1 Empaquetamiento anormal de la cromatina

Errores en la sustitución de histonas por protaminas. El daño de la cromatina / ADN de los espermatozoides puede ocurrir en los testículos, los conductos genitales masculinos y también después de la eyaculación. Durante el proceso de la espermatogénesis las histonas somáticas son hiperacetiladas y reemplazadas por las proteínas de transición nuclear (TP1 y TP2) éstas a su vez son reemplazadas por otras proteínas, conocidas como protaminas (P1 y P2) (Moradi et al., 2018)(Aoki et al., 2005). Las protaminas son las proteínas más abundantes en el espermatozoide maduro y empaquetan el genoma paterno dentro del núcleo espermático. Estas proteínas son ricas en arginina y residuos de cisteína; la gran cantidad de arginina provee una fuerte de carga positiva que facilita su unión al ADN y garantiza el reemplazo de las histonas por las proteínas de transición nuclear y éstas por las protaminas. Los múltiples residuos de cisteína son oxidados para formar puentes disulfuros entre las protaminas y estabilizar la cromatina durante los estadios finales de la maduración espermática (Hao et al., 2019).

Tanto la P1 como la P2 son necesarias para la condensación adecuada de la cromatina. La alta carga positiva de las protaminas permite la neutralización de la carga negativa del ADN, lo que genera mayor compactación en el núcleo espermático (Erenpreiss et al., 2006). Una vez que el espermatozoide pasa a través del epidídimo las protaminas se unen por enlaces disulfuro reduciendo el volumen de la cromatina, esto hace que el ADN del esperma esté seis veces más condensado que el de los cromosomas mitóticos y así el material genético esté protegido durante su trayecto a lo largo de los aparatos genitales masculino y femenino. Un defecto en la síntesis de protaminas y en la formación de puentes disulfuro afecta el empaquetamiento de la cromatina, lo que aumenta la vulnerabilidad de los espermatozoides a la fragmentación del ADN (Pradeepa & Rao, 2007).

8.1.2 Proporciones de protamina 1 y 2

Cuando la protaminación se lleva a cabo de forma incorrecta, se producen trastornos de condensación de cromatina (Sotolongo et al., 2005). Algunos estudios han demostrado que una escasa protaminación se relaciona con una mayor susceptibilidad al daño oxidativo y con una elevada fragmentación en el ADN.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de transición se reemplazan luego por protaminas 1 y 2 (P1, P2). P1 y P2 se expresan en una relación aproximada de 1: 1, se ha visto que puede existir una variabilidad en la expresión y algunos autores han descrito que en pacientes fértiles normozoospermicos dicha expresión puede variar entre 0.54 y 1.43 (Nanassy et al., 2011). Tanto el aumento como la reducción de esta proporción se han relacionado con la infertilidad masculina, lo que sugiere que las anomalías en la expresión, el procesamiento y el reemplazo de la protamina pueden ser responsables de los efectos sobre los parámetros del semen observados en los hombres infértiles afectados por una protaminación deficiente, junto con anomalías en los procesos reguladores asociados. La protaminación anormal puede resultar en una condensación insuficiente en el núcleo del espermatozoide, genera espermatozoides más vulnerables a agentes endógenos y exógenos, como nucleasas (Ribas-Maynou et al., 2014) lo que hace que el ADN

paterno sea susceptible de daño, lo que podría tener consecuencias perjudiciales sobre la embriogénesis (Francis et al., 2014)

8.1.3 Apoptosis:

La apoptosis es el término utilizado para la muerte celular programada que ocurre normalmente en muchos procesos fisiológicos. Los espermatozoides expresan marcadores de apoptosis durante la espermatogénesis y durante la maduración a través del epidídimo. En los testículos, la apoptosis es responsable de mantener la proporción entre las células germinales y de Sertoli, al eliminar las células germinales defectuosas y controlar la producción de esperma (proceso apoptótico abortivo) (Shukla et al., 2012). La presencia de moléculas implicadas en las vías de la apoptosis, como las caspasas 1, 3, 8 y 9, indica roturas del ADN de los espermatozoides bicatenarios. Las roturas de ADN de doble hebra están unidas a la matriz nuclear del esperma y están relacionadas con la falta de reparación del ADN durante la meiosis, lo que induce abortos espontáneos y fallas de implantación (Ribas-Maynou y Benet, 2019).

8.1.4 Especies reactivas de Oxigenos (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son vitales para procesos fisiológicos como la apoptosis y la capacitación, sin embargo una sobreproducción conduce a varios efectos, incluida la fragmentación del ADN espermático (SDF). Este daño en el ADN es en gran parte oxidativo y está estrechamente asociado con defectos en la espermiogénesis. Para explicar el origen de este daño en el ADN, se postuló que la espermiogénesis se interrumpe por el estrés oxidativo, lo que lleva a la creación de gametos defectuosos con cromatina mal remodelada y que son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres de oxígeno (Aitken & Curry, 2011). La fragmentación del ADN se caracteriza tanto por presentar roturas de una sola hebra (SSB) como por tener roturas de doble hebra DSB. El daño en roturas de cadena doble del ADN está relacionado con apoptosis, hidrólisis por caspasas y endonucleasas, y por radicales libres de oxígeno, haciéndolo más difícil de reparar que el de cadena sencilla (Le et al., 2020).

En el ADN que presenta daños en una sola hebra (SSB,) la otra hebra no dañada puede actuar como molde para la replicación. Las SSB son causadas por la acción de la enzima topoisomerasa abortiva o la actividad de la ADN ligasa adyacente a una lesión, que puede unirse covalentemente al fosfato y, por lo tanto, puede fijarse. Las lesiones que ocurren con más frecuencia son las modificaciones de bases, azúcares y SSB después de oxidación, alquilación, desaminación e hidrólisis espontánea. Cuando estas lesiones no se reparan, pueden comprometer la integridad del genoma y el deterioro del empaque de la cromatina puede resultar en una maduración defectuosa y la aparición de espermatozoides con aumento de la fragmentación de su ADN (Agarwal et al., 2019).

Por otro lado diversos estudios han investigado como los factores externos activan las especies reactivas de oxígeno y en consecuencia a la activación de las caspasas y endonucleasas espermáticas por los ROS que inducen la fragmentación del ADN espermático.

8.1.5 Estrés oxidativo pos testicular

Estudios recientes muestran que los espermatozoides inmaduros, que producen altos niveles de ROS, pueden inducir daño al ADN en los espermatozoides maduros. Es decir este daño se produciría tras la espermiación durante la comigración entre espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos hasta la cola del epidídimo (Wallach et al., 2010) de esta forma puede dañar el ADN de los espermatozoides directa o indirectamente a través de la activación de las caspasas y endonucleasas de los espermatozoides. Esto es consistente con el hecho de que la cocentrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen altos niveles de ROS) con espermatozoides maduros da como resultado la inducción de la fragmentación del ADN en los espermatozoides maduros, porque en estas condiciones, los espermatozoides maduros e inmaduros están en estrecho contacto.

8.1.6 Factores extrínsecos:

Las modificaciones en la remodelación de la cromatina, la apoptosis y el estrés oxidativo son tres mecanismos principales que contribuyen a la fragmentación del

ADN espermático y están interrelacionados y a su vez forman un mecanismo unificado (Moradi et al., 2018); A pesar de ser los principales factores de la fragmentación del ADN espermático, existen otras causas de acuerdo a la literatura, estos podrían ser:

8.1.6.1 Sobrepeso

De acuerdo con Le y colaboradores (2020), investigaron la relación entre el índice de masa corporal (IMC) y el síndrome metabólico en la fragmentación del ADN de los espermatozoides (SDF) y encontraron que los pacientes con sobrepeso y síndrome metabólico presentan un mayor nivel de fragmentación del ADN espermático.

Raad y colaboradores (2019) compararon los niveles de ROS intracelulares en los espermatozoides de hombres delgados y obesos. Para ello, evaluaron los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) con la prueba de nitroazul de tetrazolio en los espermatozoides móviles derivados del procedimiento swim-up de hombres obesos y delgados, y observaron un mayor porcentaje de células ROS (+) en los espermatozoides de los hombres obesos en comparación con los espermatozoides de los hombres delgados.

8.1.6.2 Diabetes mellitus

Una complicación importante de la diabetes es la alteración del sistema reproductor masculino, debido a que el metabolismo de la glucosa es un evento importante en la espermatogénesis. Diversos estudios tanto en humanos como en animales han confirmado el efecto deletéreo de la diabetes sobre las funciones sexuales, como los parámetros del semen, la fragmentación de ADN nuclear y por ello la calidad de la cromatina (Ding et al., 2015). Se ha estudiado que los espermatozoides de hombres con diabetes tipo 1 tienen defectos estructurales y fragmentación del ADN nuclear y mitocondrial, además de una disminución de la motilidad y disminución en la unión con la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación (Roessner et al., 2012)

Del mismo modo se estudió que los pacientes con DM2 tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN en comparación con los pacientes con DM1 y los controles (Condorelli et al., 2018)

8.1.6.3 Varicocele

El varicocele es una enfermedad vascular caracterizada por el agrandamiento anormal de las venas del plexo pampiniforme y es una causa bien conocida de infertilidad masculina (Finelli et al., 2021) y ocurre en aproximadamente el 35% al 40% de la población masculina humana (Fang et al., 2021). De acuerdo a diversas investigaciones se cree que estas anomalías se manifiestan en hombres que presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y daño en el ADN espermático, esto probablemente esté relacionado con una espermatogénesis defectuosa en estos pacientes. Se ha reportado que la tasa de espermatozoides apoptóticos en pacientes con varicocele es más alta que en aquellos sin varicocele (Mohammed et al., 2015). Por lo que varios autores afirman que hombres infértiles con varicoceles mostraron un daño significativamente mayor en el ADN de los espermatozoides, respaldando aún más la premisa de que el varicocele puede afectar la integridad del ADN de los espermatozoides (Gill et al., 2021) ya que los pacientes muestran parámetros seminales significativamente reducidos (volumen, número total de espermatozoides, motilidad progresiva, morfología normal) y aumento de la SDF (Finelli et al., 2021)

8.1.6.4 Exceso de glóbulos blancos

A medida que aumenta el nivel número de leucocitos seminales; el volumen seminal, la concentración, la vitalidad y la capacidad de fertilizar de los espermatozoides disminuyen; en casos más graves, la cromatina puede desnaturalizarse y fragmentar el ADN de los espermatozoides además de aumentar el número de células espermatogénicas inmaduras y de células aberrantes (Sheng Liu, et al .,2021).

8.1.6.5 Contaminación ambiental

Diversos estudios muestran la evidencia de una asociación entre la exposición a las altas concentraciones de contaminantes ambientales, contaminantes industriales y

el incremento del daño al ADN espermático. Maxim y colaboradores (2021) estudiaron la influencia de la contaminación industrial en el patrón de morfología de los espermatozoides y la fragmentación del ADN de los espermatozoides en hombres de la población general de Siberia occidental y mencionan que los residentes de Kemerovo se caracterizaron por un recuento y motilidad de espermatozoides reducidos, una fragmentación elevada del ADN, una morfología deficiente de los espermatozoides y una mayor incidencia de efectos morfológicos de la cabeza (acrosoma piriforme, alargado, redondo, anormal y cromatina vacuolada), inserción asimétrica del cuello y exceso de citoplasma residual (Kleshchev et al., 2021).

8.1.6.6 Exposición a sustancias químicas ambientales

La literatura de estudios toxicológicos indica que ciertos contaminantes ambientales pueden, al menos en dosis experimentales, inducir la fragmentación del ADN espermático (Tabla 4)(Evenson & Wixon, 2005) (Specht IO et al., 2012) y / o inducir estrés oxidativo (Aitken, 2008). Se pueden medir al menos 200 sustancias químicas exógenas en la mayoría de las personas en un momento dado, pero muy pocas sustancias químicas se han evaluado específicamente por su potencial de dañar el ADN de los espermatozoides. Estudios anteriores han proporcionado evidencia de una asociación entre la exposición a altos niveles de contaminación del aire y un mayor daño del ADN en el esperma humano (Rubes, 2007)

Contaminantes ambientales	Lugar donde se encuentran	Cita
Bisfenol A (BPA)	Plásticos	Meeker et al., 2010 Vitku et al., 2015
Triclosán	Productos antisépticos: toallas húmedas de mano, ungüentos o gel	(Zamkowska et al., 2018)
Parabenos	Derivados del ácido para- hidroxibenzoico (PHBA) que se produce de forma natural en muchas frutas y verduras,	

	como pepinos, zanahorias, cerezas, arándanos y cebollas.	
Pesticidas organofosforados		
Ftalato	Plásticos	
Cadmio	Acumulación de alimentos en: patés, mariscos, champiñones o algas secas	(Pant, Kumar, Upadhyay, Gupta, & Chaturvedi, 2015)
Plomo		
Bifenilos policlorados (PCB)	se utilizan en diferentes tipos de productos industriales, es un contaminante organoclorado	(Spanò et al., 2005)
Piretroides	Plaguicidas domésticos y Agrícolas	(Zamkowska et al., 2018)
Aflatoxinas B1 AFB1	Subproductos venenosos del hongo <i>Aspergillus</i> , que se encuentra en el suelo y que participa en la descomposición de los materiales vegetales. Las aflatoxinas se pueden encontrar en varios productos alimenticios, como maíz, sorgo, mijo, arroz y trigo.	(Komsky-Elbaz et al., 2018)
Microcistina-LR	Toxinas cianobacterianas	(Li et al., 2008)
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)	Formado durante la fabricación de hidrocarburos clorados puede acumularse en la cadena alimentaria	(Lavranos et al., 2012)

Tabla 4. Se muestra algunas de sustancias toxicas, químicas, ambientales que inducen la fragmentación del ADN espermático, mediado por estrés oxidativo:

8.1.6.8 Temperatura

El efecto de la temperatura de almacenamiento y la criopreservación sobre el ADN de los espermatozoides se ha estudiado en varias especies. Se sabe que las temperaturas entre 5 ° C y 15 ° C mantienen el ADN intacto durante períodos de tiempo más largos que temperaturas más altas como 20 o 37 ° C, y que cuanto más alta sea la temperatura, más drástico será el aumento de SDF en los conejos, perros y toros (Lo CC et al.,2002) (Prinosilova et al., 2012) . Sin embargo, en especies como los elefantes, el semen enfriado criopreservado reduce notablemente la fertilidad y la estabilidad del ADN del esperma durante la incubación a 37 °C (Imrat et al., 2012). Por otro lado, aunque la criopreservación de espermatozoides es útil para preservar la fertilidad masculina antes de la terapia de enfermedades malignas, vasectomía o tratamientos quirúrgicos de infertilidad en humanos, y para su uso en programas de reproducción artificial asistida para el mejoramiento genético en especies animales, esta técnica puede conducir a efectos nocivos, cambios en la estructura y función de los espermatozoides. Diferentes estudios sobre la dinámica de la fragmentación del ADN de los espermatozoides antes y después del almacenamiento de los espermatozoides muestran que la criopreservación es un tema importante que debe tenerse en cuenta, ya que puede disminuir la longevidad del ADN (Jackson et al., 2010) (Gosálvez et al., 2010). La pérdida de la calidad del ADN espermático observada en todas las especies de mamíferos analizadas hasta ahora puede tener una incidencia negativa en el resultado reproductivo (Gosálvez et al., 2011).

8.6.1.9 Tabaquismo

Se encontraron investigaciones las cuales demuestran que fumar ciertas cantidades de cigarrillos puede afectar la fragmentación del ADN espermático. Mosfata y colaboradores (2018) exploraron los efectos del tabaquismo sobre los parámetros del semen y la fragmentación del ADN en 95 pacientes infértiles, los cuales se dividieron en 45 hombres no fumadores infértiles y 50 fumadores masculinos infértiles. A su vez los fumadores se subdividieron según el número de cigarrillos fumados por día. Y encontraron que el porcentaje de condensación anormal de cromatina en los espermatozoides fue significativamente mayor en los fumadores,

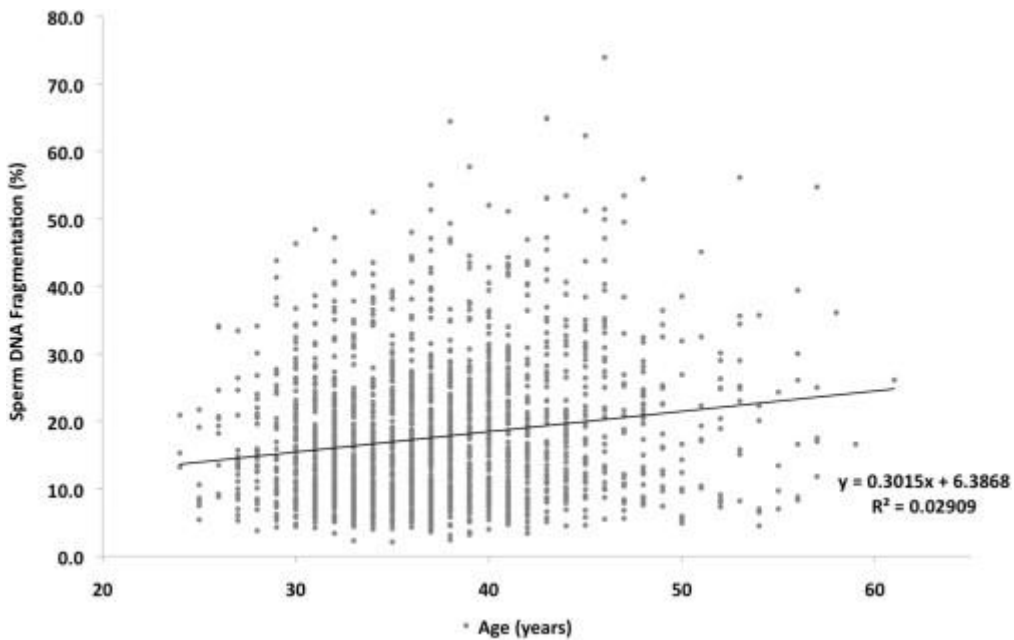
en comparación con los no fumadores. Estas anomalías también fueron proporcionales al número de cigarrillos fumados por día y a la duración del tabaquismo lo que los resultados indican que fumar cigarrillos tiene efectos perjudiciales sobre los parámetros del semen (Mostafa et al., 2018)

Por lo que fumar cigarrillos puede aumentar el nivel de ROS en el plasma seminal, disminuir el recuento total de espermatozoides y la motilidad progresiva de los espermatozoides e inducir malformaciones y fragmentación del ADN espermático en varones antes de la concepción. (Darvandi et al., 2019)

8.1.6.10 La edad

De acuerdo a diversos estudios demuestran que un aumento significativo en el daño del ADN de los espermatozoides se debe a la edad, los hombres de 40 años o más, también corren un mayor riesgo de presentar daño en el ADN de los espermatozoides (Alshahrani et al., 2014) y sugieren que la fragmentación del ADN es significativamente menor en hombres menores de 35 años (Belloc et al., 2009). El aumento de la edad paterna se asocia con disminuciones significativas en varios parámetros espermáticos, incluido el volumen del semen, el recuento celular, la motilidad, la morfología y la viabilidad de los espermatozoides (Halvaei et al., 2020)

En un estudio de Belloc y colaboradores (2014) evaluaron la fragmentación del ADN espermático en los hombres de parejas normozoospermicos sometidas a evaluación de infertilidad. Y en el grupo de 1974 hombres normozoospermicos, el %SDF se correlacionó positivamente con la edad paterna ($r = 0,17$, $P < 0,0001$; Fig. 1)



Grafica 1. Correlación entre la edad paterna y el porcentaje de fragmentación del ADN espermático en 1974 hombres normozoospermicos(Halvaei et al., 2020).

Del mismo modo la espermatogénesis también puede verse afectada con el envejecimiento, lo que resulta en una morfología anormal de los espermatozoides en hombres mayores (Halvaei et al., 2020)

8.1.6.11 Alcohol

En un estudio con ratones sometidos a la ingesta de alcohol en 4 tratamientos Akang y colaboradores (2017) encontraron que el alcohol incremento del estrés oxidativo y la Fragmentación al ADN espermático alterando la capacidad de los espermatozoides para fertilizar los ovocitos y el número de fetos engendrados por los animales que recibieron alcohol disminuyó significativamente ($P < 0.05$) (Akang et al., 2017). El tabaquismo y el consumo de alcohol por separado y combinado tienen un efecto deletéreo sobre los parámetros de los espermatozoides y el SDF. Se sugiere que ambos hábitos pueden contribuir a los problemas de infertilidad (Anifandis et al., 2014).

8.1.6.12 Quimio / Radioterapia

En las últimas décadas, numerosos informes han confirmado el impacto negativo de las radiaciones ionizantes y no ionizantes en la infertilidad masculina (Agarwal et

al., 2008)(Ahmad et al., 2017). Las radiaciones ionizantes de los equipos médicos y la radioterapia para el tratamiento del cáncer se correlacionan positivamente con la SDF y la disminución de la calidad del espermatozoides (Ahmad et al., 2017).

Se ha informado previamente que la exposición a quimioterapia y radioterapia también puede resultar en la inducción de la fragmentación del ADN de los espermatozoides. En general, se cree que los tratamientos contra el cáncer afectan negativamente a la fertilidad masculina y que la reducción de la producción de espermatozoides se debe a los efectos citotóxicos de la quimioterapia o la radioterapia sobre el epitelio espermatozoidal (Morris, 2002)

Los estudios también han confirmado que la radioterapia en los tumores testiculares de células germinales se asocia con un aumento de la SDF en comparación con la quimioterapia sola (Smit et al., 2010)]. Las radiaciones no ionizantes de teléfonos móviles, Wi-Fi y otras fuentes radiactivas también tienen efectos negativos importantes en la fertilidad masculina y la integridad del ADN de los espermatozoides (Agarwal et al., 2008)

8.1.6.13 Medicamentos y vacunas

En hombres con parámetros seminales normales, la paroxetina indujo una fragmentación de los espermatozoides en una proporción significativa de pacientes humanos (Tanrikut et al., 2010)

Algunas vacunas afectan negativamente la calidad del ADN de los espermatozoides, se ha demostrado que Miloxan (vacuna para la Inmunización activa y pasiva contra enfermedades del ganado bovino, ovino, y caprino) aumenta 10 veces el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en el carnero. Sin embargo, este impacto negativo parece reversible y, por tanto, debe evitarse la recogida de muestras de espermatozoides hasta al menos un mes después de la vacunación. Se sugiere que el apareamiento también debe realizarse hasta 40 días después de haber administrado la vacuna (Gosálvez et al., 2014)

8.1.6.14 Infecciones bacterianas

La infección bacteriana puede afectar negativamente a diferentes partes del tracto genital masculino y, posteriormente, causar alteraciones de la espermatogénesis, la fertilidad masculina y pueden alterar los parámetros del semen. Las bacterias también pueden inducir diferentes daños en los espermatozoides, como la fragmentación del ADN, la peroxidación de la membrana celular y el deterioro del acrosoma. Dichos efectos negativos se menciona que pueden estar mediados por toxinas y metabolitos secretados por bacterias o por la unión directa de bacterias en los espermatozoides y la activación posterior de vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, la apoptosis y la inflamación (Oghbaei et al., 2020).

Los pacientes humanos con infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* tienen una mayor fragmentación del ADN espermático en comparación con los hombres fértiles. Este aumento es proporcionalmente mayor que la influencia sobre los parámetros clásicos del semen y podría resultar en una disminución del potencial de fertilidad. La terapia con antibióticos parece ser importante para proporcionar un remedio para los altos niveles de fragmentación del ADN inducidos por infecciones (Gallegos et al., 2008). Además en un estudio realizado por Fatemeh Eini y colaboradores (2021), trataron 172 pacientes investigados por infertilidad, 60 (34,88%) pacientes tuvieron un cultivo positivo para bacterias patógenas de diferentes especies y observaron que, la fragmentación del ADN de los espermatozoides fue significativamente mayor en las muestras infectadas que en las no infectadas. La infección bacteriana se correlaciona significativamente con la leucocitospermia, esta relación podría afectar el potencial de fertilidad masculina al disminuir la motilidad, la morfología y la integridad del ADN de los espermatozoides (Eini et al., 2021)

8.1.6.15 Temperatura de los testículos

Se sabe que un aumento de temperatura en los testículos puede provocar la producción de espermatozoides de mala calidad e infertilidad, además el estrés por calor escrotal puede comprometer la integridad del ADN de los espermatozoides. (Banks et al., 2005).

La espermatogénesis necesita una temperatura más baja en el escroto que se mantengan entre 2° y 8 ° C por debajo de la temperatura corporal. Parte de los hombres infértiles tienen una temperatura en el escroto es más alta que la de los hombres con función reproductiva normal, y su esperma perderá cualidades gradualmente a medida que aumenta la temperatura (Mínguez-Alarcón et al., 2018). Estudios en ratones, muestran que las roturas de la cadena de ADN estaban presentes en los espermatozoides recuperados de los testículos sometidos a 40 o 42 ° C incluso dentro de la primera hora de exposición al calor (Muratori et al., 2015). Además, el estrés por calor paterno resultó en una reducción de la tasa de embarazo, el peso de la placenta y el tamaño de la camada (Paul et al., 2008).

Los testículos están compuestos por diferentes tipos de células, incluidas las células madre espermatogoniales (SSC), los espermatozoides, las células de Leydig y las células de Sertoli, que tienen diferentes respuestas celulares al estrés por calor (Figura 6)

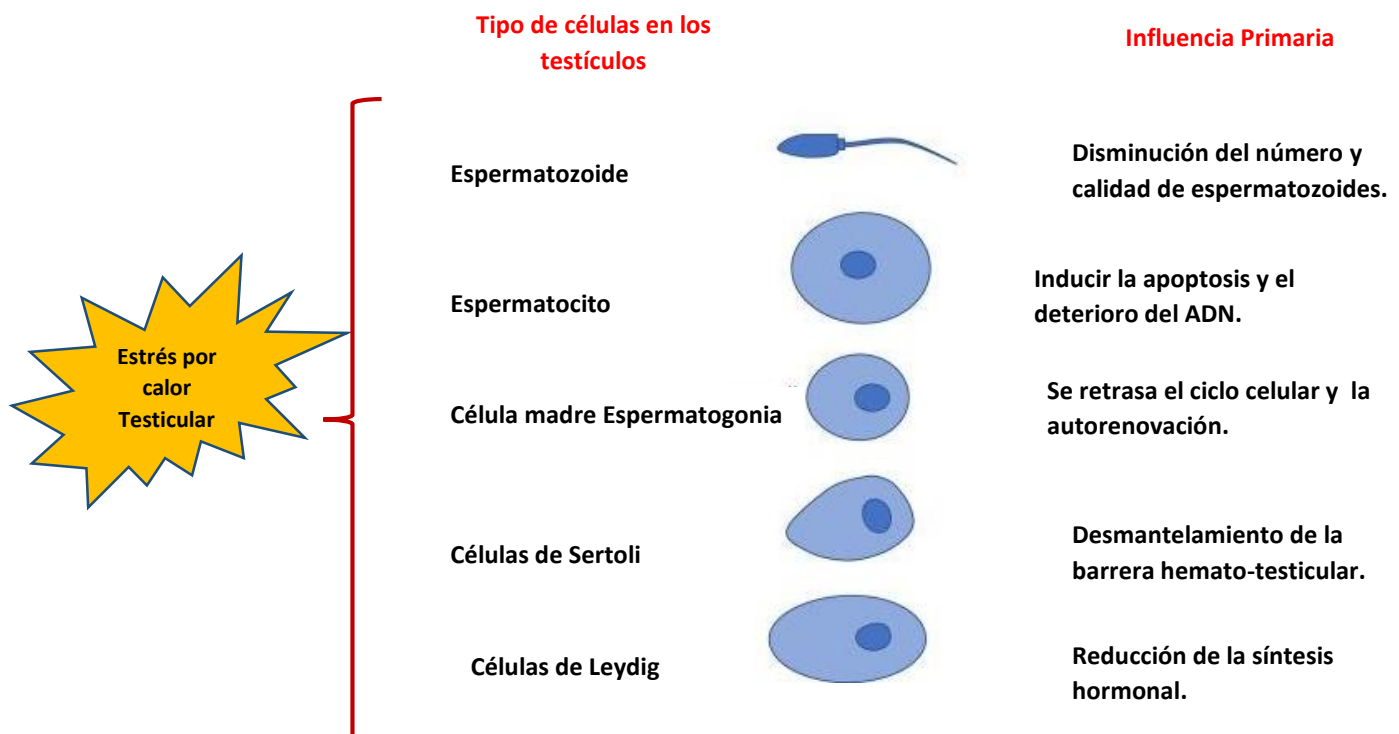
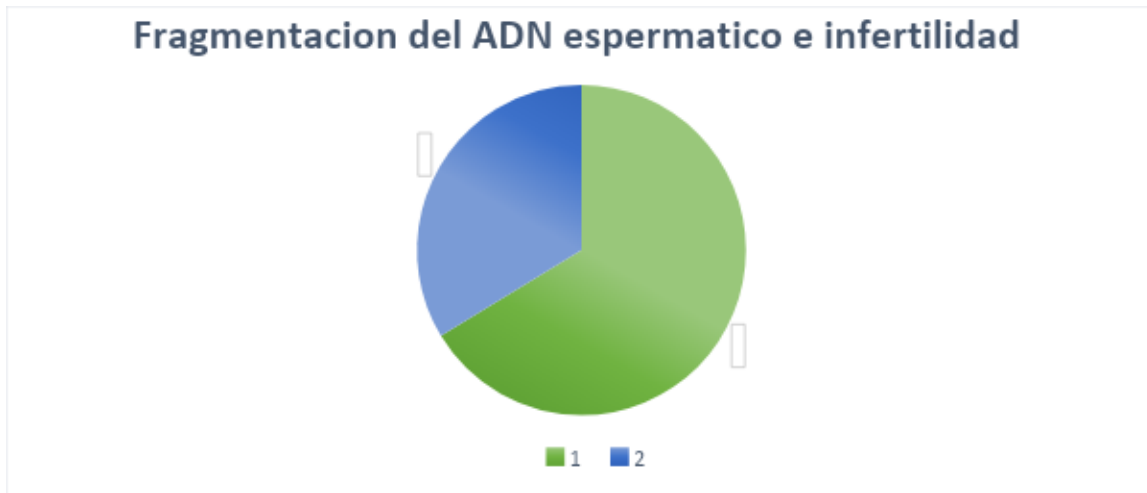


Figura 6: El estrés por calor puede afectar a la mayoría de los tipos de células de los testículos, incluidas las espermatogonias, los espermatozoides, las células madre espermatogoniales, las células de Sertoli y las células de Leydig. Sin embargo, el estrés por calor tiene una variedad de impactos en estos tipos de células. (Cai et al., 2021)

8.2 Asociación entre la fragmentación del ADN y la infertilidad masculina:

La integridad del ADN de los espermatozoides es indispensable para el nacimiento de una descendencia sana (Krawetz, 2005). Se ha publicado una cantidad sustancial de literatura que fortalece la teoría de una conexión entre el aumento de la fragmentación del ADN y la infertilidad, (Grafica 1)



Grafica 1: En la gráfica se representa de color verde los artículos encontrados que apoyan la idea de que la fragmentación del ADN espermático produce infertilidad. En color azul artículos en la que los autores mencionan que la fragmentación del ADN espermático es un evento independiente a la infertilidad.

Por lo que existe un aumento en la evidencia que indica que la fragmentación del ADN del espermatozoide (SDF), tiene un papel notable en la infertilidad masculina y el éxito reproductivo (Agarwal, Majzoub, et al., 2016 ; Aitken, 2016 , 2017a ; Bui et al. , 2018 ; Esteves, Gosálvez, et al., 2015 ; Rima et al., 2016 ; Saleh et al., 2002 ; Sergerie et al., 2005), particularmente cuando los niveles de daño del ADN son altos (González - Marín et al., 2012 ; Lopes et al., 1998 ; Simon et al., 2010 , 2011).

8.2 Fragmentación del ADN y correlación con los parámetros seminales

El análisis seminal continúa siendo el paso inicial en la valoración del varón estéril. El manual más reciente publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010 para el examen y procesamiento del semen humano, constituye una

versión muy completa que provee descripciones detalladas de los métodos y sus limitaciones. Sin embargo, sin restarle importancia a las guías de la OMS para la estandarización y evaluación del semen, la interpretación diagnóstica del análisis seminal sigue estando sujeta a investigación.

Se ha analizado que en el eyaculado masculino existe una correlación entre las alteraciones en la organización del material genómico del ADN y su potencial de fertilización; enfatizando el hecho de que la estabilidad del ADN espermático es un criterio a tener en cuenta para considerar si un espermatozoide podría ser fértil o no.

Se ha establecido una relación entre el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales y la fragmentación del ADN. Estas estructuras anormales de cromatina y roturas de cadena de ADN se correlacionan con formas severas de anomalías morfológicas como la megalocefalia y múltiples colas o la incidencia de globozoospermia acompañada de tasas altas de aneuploidia. De acuerdo a la literatura indican que el % de DFI de espermatozoides no solo se asocia con la morfología, sino que además se ha correlacionado negativamente con atributos funcionales de los espermatozoides como viabilidad, integridad del acrosoma, potencial de membrana mitocondrial y, posteriormente, con la fertilidad.

Viabilidad: De acuerdo a las investigaciones en humanos, las tasas de fragmentación del ADN espermático se han correlacionado con las tasas de viabilidad de los espermatozoides. La viabilidad reducida de los espermatozoides se asocia con una alta fragmentación del ADN espermático, mientras que, por el contrario, la viabilidad alta de los espermatozoides se asocia con tasas bajas de fragmentación del ADN espermático. En un estudio de Samplaski y colaboradores, 2015 manifi

están que en hombres con altos niveles de viabilidad de los espermatozoides $\geq 75\%$ la fragmentación del ADN era $\leq 30\%$. Mientras que bajos niveles de viabilidad de los espermatozoides $\leq 30\%$, la fragmentación del ADN era $\geq 30\%$.

8.3 Impacto de la fragmentación del ADN espermático en el embarazo y las Técnicas de reproducción asistida

8.3.1 Técnicas de reproducción asistida (TRA)

Varios estudios mostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI) de los espermatozoides alto se asoció con un resultado deficiente del TAR (Cissen et al., 2016). Las técnicas de reproducción asistida se ven comprometidas dependiendo del grado de afectación en el índice de fragmentación espermático, ya que el éxito de estas técnicas radica en la integridad estructural y funcional de los gametos. Por su parte, los defectos en la cromatina del espermatozoide traen resultados negativos en las técnicas de Fertilización in vitro (FIV) e Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) dando lugar a embriones de mala calidad y aborto (Góngora-Rodríguez & Fontanilla-Ramírez, 2010).

Sin embargo para solucionar este problema Vončina y colaboradores (2021) propusieron incluir un análisis DFI antes de la toma de decisiones del primer intento de TAR, esto puede mejorar los resultados generales del tratamiento. En el 18% de las parejas con un DFI $\geq 20\%$ en las que, según los criterios tradicionales, se realizó una FIV estándar, la tasa acumulada de nacidos vivos (CLBR) fue menor que en aquellas con un DFI $< 20\%$, mientras que el nivel del DFI no jugó ningún papel de las parejas tratadas por ICSI. Aunque una diferencia del 4% en CLBR (entre 51,4% y 56,6%) podría considerarse relativamente pequeña, como se indica en una revisión sistemática publicada recientemente, incluso una mejora del 1% equivaldría a muchos miles de nacidos vivos adicionales a nivel mundial cada año.

En un estudio de Puga Molina y colaboradores (2021) investigaron que la obesidad y la diabetes tienen un impacto perjudicial en las tecnologías de reproducción asistida (TRA). Debido a que, al usar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides utilizando espermatozoides de los hombres con obesidad tienen una menor probabilidad de terminar en un nacido vivo. Este patrón en el desarrollo embrionario se ha relacionado con una mayor tasa de espermatozoides con ADN fragmentado y con modificaciones en las vías de señalización que no permiten que los embriones avancen más en el proceso de desarrollo.

Afortunadamente, los procedimientos de selección de espermatozoides están en constante desarrollo y eventualmente permitirán a los médicos seleccionar espermatozoides de mayor calidad y con baja fragmentación de ADN para utilizarlos en ART posteriores.

8.3.2 Fragmentación y embarazo

De acuerdo a la literatura el impacto de SDF en el éxito reproductivo dependerá del equilibrio entre la extensión del daño en el ADN y la capacidad de reparación del ADN del ovocito (Champroux et al., 2016 ; Menezo et al., 2007). Por lo que se ha postulado que Si el daño del ADN espermático que excede la capacidad de reparación del ovocito, y el ovocito falla en la reparación del daño del ADN, influirá en el potencial de desarrollo del embrión y la salud de la descendencia (Martin et al. 2019 ; (Hao et al., 2019)). Como resultado adverso, el embrión no puede desarrollarse o implantarse en el útero o puede abortar naturalmente en una etapa posterior. Por el contrario, si los mecanismos de reparación del ADN existentes dentro del ovocito son capaces de restaurar un genoma biológicamente estable, puede ocurrir una singamia normal y el subsiguiente desarrollo embrionario (Esteves et al., 2021).

Se ha reportado que la calidad embrionaria se ve estrechamente relacionada con el índice de fragmentación espermática, las tasas elevadas de fragmentación del ADN de los espermatozoides se han correlacionado positivamente con el deterioro de la fertilidad, incluidos tiempos más prolongados en lograr la concepción, deterioro de la división del embrión, deterioro de las tasas de implantación, mayores tasas de aborto espontáneo y mayor riesgo de pérdida del embarazo tanto después de la fertilización in vitro como de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Un metanálisis de cuatro estudios, con un total de 1962 hombres que evaluaron la relación entre la fragmentación del ADN de los espermatozoides y los embarazos por inseminación intrauterina, se encontró que los hombres con una fragmentación del ADN <30% tenían más probabilidades de lograr un embarazo o un nacimiento vivo ($p = 0,0001$) (Evenson & Wixon, 2005)(Spanò et al., 2000b). El segundo estudio analizó la relación entre la fragmentación del ADN y los embarazos de fertilización

in vitro, y encontró que las parejas tenían ~ 2 veces más probabilidades de quedar embarazadas si la tasa de fragmentación del ADN de los espermatozoides era <30%(Henkel et al., 2004). Estos estudios y otros respaldan la idea de que las muestras de semen con $\geq 30\%$ de fragmentación del ADN espermático mediante el ensayo de estructura de cromatina espermática tienen una fertilidad reducida (Henkel et al., 2004).

De acuerdo con lo anterior, Oleszczuk (2016) clasificó las DFI <20% como normales y las DFI $\geq 20\%$ como altas. Se observó que el aborto espontáneo aumentaba significativamente cuando la DFI era > 40%. Por lo tanto, se utilizó un DFI del 40% como nivel de corte al analizar la tasa de aborto espontáneo. Al utilizar el ensayo de estructura de los cromosomas de los espermatozoides, se ha demostrado que las parejas con una fragmentación del ADN de las células de <40% tienen una probabilidad de embarazo 10 veces mayor a través del coito natural que aquellas con una fragmentación del ADN > 40%. Asimismo, se ha demostrado que las pacientes con inseminación intrauterina tienen 8,7 veces más probabilidades de tener un nacimiento vivo si la fragmentación del ADN es $\leq 27\%$. Por último, una tasa de fragmentación del ADN $\geq 30\%$ se ha asociado con un aumento de las tasas de aborto espontáneo.

8.4 Técnicas utilizadas para determinar la fragmentación en espermatozoides humanos:

En las últimas dos décadas se han diseñado pruebas para medir la fragmentación del ADN espermático y predecir el efecto que ocasiona en los resultados de fertilidad ya sea tras concepción natural o por reproducción asistida (Llata et al 2017).

El ADN del espermatozoide con fragmentación se presenta en raras ocasiones en hombres fértiles, pero puede encontrarse en un porcentaje más amplio de varones infértiles con análisis de semen normales en los demás aspectos. Estas pruebas pueden detectar infertilidad que se pasa por alto en un análisis convencional de semen (Walsh & Smith, 2015).

Existen diferentes pruebas de fragmentación del ADN espermático disponibles para uso clínico, estos se dividen en dos categorías principales:

1. **Los métodos directos:** que miden directamente las roturas del ADN del espermatozoide: uniendo una sonda o marca al daño (p. ej., TUNEL) o visualizando la dispersión de ADN fragmentado cuando se aplica un campo eléctrico a los espermatozoides retenidos en un gel (p. ej., el ensayo COMETA) (Pacey, 2018).
2. **Los métodos indirectos:** que miden la susceptibilidad del daño al ADN espermático en las condiciones generadas en el ensayo (p. ej., el ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA) o la prueba de dispersión de cromatina espermática) (Pacey, 2018).

Los métodos indirectos requieren de un paso previo de desnaturalización, a pH ácido o alcalino, para detectar la lesión del ADN. De esta forma, los métodos directos determinan el “daño real”, mientras que los indirectos el “daño potencial” del ADN. (Portella & Gonzales, 2016).

Las fortalezas y debilidades de cada enfoque han sido ampliamente debatidas en la literatura y pueden parecer confusas (Tabla 4). Debido a esto la experiencia clínica no ha logrado satisfacer las expectativas iniciales, aunque estas pruebas podrían ser de utilidad en parejas con infertilidad inexplicable con repetidos fracasos de fertilización in vitro (IVF) (Ghadir et al., 2015)

Las pruebas más utilizadas incluyen:

Método	Ventajas	Desventajas	Instrumental	Base del Ensayo	Parámetro evaluado	Principio del análisis
TUNEL	Cumple con parámetros de control de calidad Puede detectar tanto el daño de hebra simple como doble.	Equipos sofisticados y costosos Capacitación técnica: Requiere operador experimentado	Microscopio de fluorescencia, cartometría de flujo	Identifica las roturas en las secuencias de DNA Agregando nucleótidos marcados al extremo libre del ADN	% de células con ADN marcado	Rotura de la hebra simple y doble de ADN
COMETA	Bajo Costo Requiere bajo número de células. Correlación con parámetros seminales	Baja reproducibilidad. Técnica laboriosa. Requiere observador experimentado.	Microscopio de fluorescencia electroforesis de ADN	Electroforesis de espermatozoides individuales	% de espermatozoides con cola (fragmentos de ADN)	Rotura de la hebra simple y doble o sólo doble de ADN
SCD	Análisis simple de resultados. Bajo costo	Baja reproducibilidad. Interpretación Subjetiva Lenta ejecución	Microscopio de fluorescencia, campo claro	Formación de un halo de ADN de espermatozoides sumergidos en agarosa	% de espermatozoides con halo pequeño o ausente	Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida
SCSA	Utilidad clínica: Punto de corte 30% para diferenciar entre pacientes fértiles e infértiles	Equipo sofisticado y costoso (Citometría de flujo). Capacitación técnica	Citometría de flujo	Tinción con AO y análisis por cartometría de flujo	DFI-relación de espermatozoides rojos a espermatozoides rojos y verdes	Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida
AO	Metodología Simple: Detecta la proporción de espermatozoides muertos	Baja reproducibilidad Interpretación Subjetiva: aporta información limitada	Microscopio de Fluorescencia	Tinción con AO y conteo manual de células rojas y verdes	% de células con fluorescencia roja	Susceptibilidad del ADN a la desnaturalización ácida

	dependiendo del grado de desnaturalización del ADN nuclear.	del estatus nuclear del espermatozoide				
(ISNT)	Detecta daño directamente.	Baja Reproducibilidad. Requiere operador experimentado	Microscopio de Campo claro. Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo	Se basa en la utilización de enzimas exógenas que permiten incorporar porciones de nucleótidos específicas y así reconocer células cuyos núcleos están en estado de necrosis	Cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato)	Detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables de daño endógeno en su ADN.
DBD-FISH	Evalúa el daño en células Individuales in situ, en Secuencias específicas de DNA.	Técnica laboriosa. Requiere operador experimentado	Microscopio de fluorescencia. Citometría de flujo	Se basa en la detección y cuantificación de roturas en todo el genoma y también en secuencias específicas del ADN (Fernández y Gosálvez, 2002)	Detectar y cuantificar las roturas de ADN	Revela modificaciones estructurales de la cromatina

Tabla 5: Se muestra un cuadro comparativo entre las diferentes técnicas para medir la fragmentación del ADN espermático.

8.4.1 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferasemediated dUDP nick-end labelling assay).

El ensayo TUNEL es una de las pruebas más utilizadas para evaluar el daño del ADN de los espermatozoides. El método se basa en la unión específica de la deoxinucleotido transferasa terminal (TdT) a las terminaciones 3'OH del ADN, produciendo la síntesis de un polímero de polideoxinucleotido. El TdT se utiliza para incorporar deoxiuridina biotinilada en los sitios de roturas del ADN para luego amplificar esta señal y ser visualizada por microscopio de fluorescencia (Ribeiro et al., 2017). La fluorescencia será proporcional al número de roturas de hebras (Zini y Agarwal 2011 b). La prueba TUNEL consiste respectivamente en la fijación y permeabilización de los espermatozoides, el marcado de fragmentos de ADN, la tinción y la evaluación de los espermatozoides. Es posible realizar este ensayo en un portaobjetos utilizando microscopía de fluorescencia o en un citómetro de flujo. Algunos estudios estandarizaron el ensayo TUNEL para hombres sanos e infértiles (Sharma et al., 2010, 2016)

8.4.2 Ensayo Cometa

La prueba COMETA o electroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo, para cuantificar el daño en el ADN de células individuales al determinar el número de células fragmentadas. Las células con mayor fragmentación del ADN migran distancias largas hacia el ánodo sobre un campo electroforético adoptando una imagen de cometa, mientras que los espermatozoides con núcleos sin fragmentación, sólo muestran una estructura compacta sin desplazamiento de ADN. En esta metodología las células serán colocadas en gel de agarosa en un portaobjeto y sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfidrílo de las protaminas que permite que el ADN fragmentado puedan migrar en un proceso de electroforesis durante un corto tiempo. Para visualizar el ADN de las células se teñirán con anaranjado de acridina.

La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola, que a su vez pueden utilizarse también otros parámetros de medida, como el "momento de la cola", que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción

total del ADN de la cola). La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de poder detectar fragmentación de simple o doble cadena del ADN espermático en una sola célula.

La fluorescencia relativa de la cola del cometa, en relación con la cabeza del espermatozoide, proporciona el grado de daño del ADN del espermatozoide. Las imágenes se seleccionan aleatoriamente y se analizan mediante clasificación visual en grados de I a IV, de acuerdo con la intensidad del daño del ADN (Hamilton et al., Referencia Hamilton, Castro, Delgado, Assis, Siqueira, Mendes, Goissis, Muiño-Blanco, Cebrián-Pérez, Nichi, Visintin y Ortiz D'Ávila Assumpção 2016). El grado I consiste en espermatozoides con un halo circundante y núcleos teñidos, sin una cola de cometa evidente, lo que indica poca fragmentación. El grado II consiste en espermatozoides con formación de cola de cometa y una luz central pálida, lo que indica daño en el ADN. El grado III consiste en espermatozoides con colas de cometa completamente formadas, pero con el núcleo parcialmente teñido, lo que indica un daño evidente en el ADN, y el grado IV consiste en espermatozoides con una cola de cometa completamente formada y con un núcleo completamente teñido, lo que indica una intensa fragmentación del ADN. La Figura 2 muestra un ejemplo de estos grados de cometa.

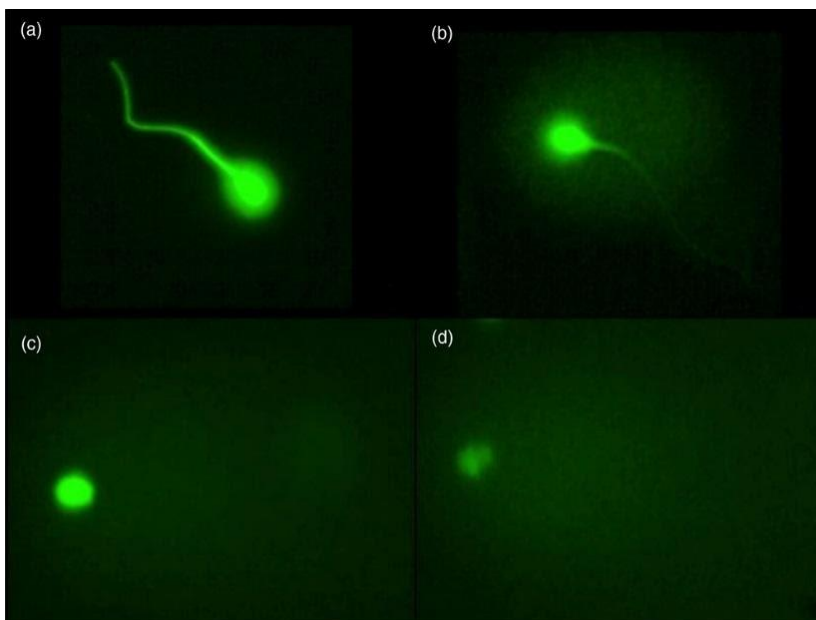


Figura 7. .Microscopía de fluorescencia del grado de fragmentación del ADN de los espermatozoides según lo revelado por la prueba del cometa en el esperma de carnero. Portaobjetos teñidos con Syber Green (SYBR green I, Sigma), diluido 1: 1000, durante 1 h. (a) Daño del ADN del esperma de grado I. (b) Daño en el ADN de los espermatozoides de grado II. (c) Daño en el ADN de los espermatozoides de grado III. (d) Daño en el ADN de los espermatozoides de grado IV. Aumento de $\times 200$.(Hamilton & Assumpção, 2020)

8.4.3 Fluoróforo metacromático naranja de acridina (AO).

AO se intercala con las hebras de ADN y emite un color verde, lo que indica la presencia de ADN de doble hebra, mientras que el rojo indica la presencia de ADN de una sola hebra, lo que indica la desnaturalización de la estructura de la cromatina (ADN de esperma fragmentado). Los espermatozoides pasan por un citómetro de flujo, y la relación obtenida entre el rojo y la fluorescencia total se utiliza para determinar el índice de fragmentación del ADN (DFI) (Evenson et al ., 2020). El ADN de los espermatozoides con roturas es muy susceptible a la desnaturalización; por lo tanto, los espermatozoides con mayor DFI tienen ADN dañado.

La integridad del ADN del esperma se evalúa cualitativamente mediante citómetro de flujo después de la desnaturalización inducida por calor o ácido utilizando el fluoróforo metacromático naranja de acridina (AO). (Hamilton & Assumpção, 2020)

8.4.4 Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA).

El ensayo se basa en la detección de la fragmentación del ADN mediante citometría de flujo. El ADN del esperma se desnaturaliza con ácido (Inicialmente se trata la muestra de semen con un pH de 1.2 para abrir las cadenas de ADN) en los sitios de rotura de la cadena de ADN y posteriormente se tiñe con el colorante catiónico fluorescente Acridine Orange (AO). En este ensayo, AO se une al ADN en una proporción de aproximadamente dos moléculas de AO por grupo fosfato.

Cuando el láser del citómetro de flujo ilumina las células, AO emite fluorescencia con una emisión verde cuando se une al ADN bicatenario (db) y una emisión roja cuando se une al ADN de una sola hebra (ss). Además, el citómetro de flujo mide la dispersión frontal y lateral de la muestra y esto puede ayudar a excluir los desechos de la muestra. Por lo general, se analizan un total de 5000 a 10 000 células. El

índice de fragmentación del ADN (DFI) se describe como la relación porcentual de la fluorescencia roja con la fluorescencia verde + roja (Rex et al., 2017)

A partir de los resultados obtenidos mediante la técnica SCSA se desarrolló el índice de fragmentación que describe la proporción de espermatozoides que presentan roturas de ADN en relación con los espermatozoides teñidos en verde que no tienen. SCSA es la más estudiada desde el punto de vista clínico, aunque las tres pruebas son referidas para detectar fragmentación del ADN.

8.4.5 Prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD)

La prueba de SCD mide la ausencia de daño en el ADN del espermatozoide y se describió por primera vez en el espermatozoide humano (Fernández et al., 2003). La prueba se basa en el principio de que los espermatozoides con ADN fragmentado no producen un halo de bucles de ADN dispersos, incluso después de la desnaturalización ácida y la eliminación de proteínas nucleares. En esta prueba, la suspensión de espermatozoides se mezcla con agarosa de bajo punto de fusión, secuencialmente esta suspensión se pipetea en un portaobjetos pre revestido con agarosa estándar. Después del secado, los portaobjetos se someten a desnaturalización ácida para generar cadenas de ADN monocatenario restringido a partir de roturas de ADN. Con fluorocromos de ADN específicos y un microscopio de fluorescencia, el ADN disperso se ve como un halo que rodea los núcleos. Si el ADN está fragmentado, se observa poca dispersión que resulta en un pequeño halo. Esto hace posible detectar espermatozoides con mayor cantidad de fragmentación de ADN (Rex et al., 2017)

En realidad, la prueba SCD mide la ausencia de daño, no la cantidad de ADN que lo presenta. Es una técnica sencilla, rápida y altamente reproducible. Se comercializa en forma de kit y por lo tanto no requiere de una instrumentación compleja y es fácilmente evaluada por técnicos de laboratorio.

8.4.6 Análisis de in situ nick translation (ISNT)

Este ensayo cuantifica la incorporación dUTP (desoxiuridin trifosfato) biotinilado a las roturas del ADN de cadena sencilla en una reacción catalizada por la polimerasa I. El ensayo ISNT detecta los espermatozoides que contienen valores apreciables

de daño endógeno en su ADN. Los resultados del análisis de ISNT indican la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide durante su maduración (Agarwal y Allamaneni, 2005). Permite cuantificar las roturas presentes en el ADN en función de la intensidad de señal producida. Esta técnica se ha utilizado en el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide

8.4.7 DBD-FISH

La técnica de DBD-FISH (Double) permite detectar y cuantificar las roturas de ADN y los sitios alcalino lábiles en células individuales (Cortés-Gutiérrez et al., 2014a). Se basa en la detección y cuantificación de roturas en todo el genoma y también en secuencias específicas del ADN (Fernández y Gosálvez, 2002).

Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del DNA a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el DNA generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de DNA. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo 22. Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria por razones similares a las descritas previamente (Viviana Álvarez Gonçalvez et al., n.d.).

Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño de célula a célula, in situ, en secuencias específicas del DNA.

9. DISCUSION:

9.1 CAUSAS DE LA FRAGMENTACION

En el presente estudio se investigó las causas que inducen la fragmentación del ADN en individuos con diagnóstico de normozoopermia y sus consecuencias en la salud reproductiva. En numerosos estudios se reflejó que cada vez es mayor el interés en las investigaciones sobre el aumento de la fragmentación del ADN espermático como causa de infertilidad en el varón (ver Tabla 3).

A pesar de que existen números estudios, la definición exacta de infertilidad inexplicable sigue siendo un tema de debate, se cree que la etiología de la infertilidad por parte del factor masculino es multifactorial, pero no se comprende bien y casi la mitad de los casos se consideran idiopáticos o inexplicables.

En el presente estudio se investigó y encontró, que existen diversos factores que provocan la fragmentación del ADN en los espermatozoides, enlistando quince causas, entre ellas están: malos hábitos de vida (fumar, tomar), problemas de salud (sobrepeso u obesidad, infecciones de las vías urinarias) y exposición a tóxicos ambientales, además de la edad avanzada, quimioterapia, radiación, varicocele.

Estas condiciones pueden promover la fragmentación del ADN espermático, provocando principalmente una espermatogénesis defectuosa, apoptosis abortiva y estrés oxidativo, siendo las tres teorías principales en la literatura sobre las causas potenciales del daño en el ADN del espermatozoide (Bui et al., 2018). Incluso se ha demostrado que en las muestras de semen que presentan fragmentación de ADN, se observan niveles más altos de especies reactivas de oxígeno (Agarwal et al., 2019).

Algunas causas como la edad avanzada en los varones, se discute mucho si provoca fragmentación del ADN, debido a que estudios en humanos sugieren que ni la capacidad fertilizante y los parámetros del semen evaluados de forma rutinaria ni la cantidad de espermatozoides con ADN fragmentado se ven afectados por la edad masculina (Winkle et al., 2009). Sin embargo de acuerdo con investigaciones recientes, diversos autores afirman que las mayores concentraciones del daño al

ADN se asocian con edad paterna avanzada. De hecho varios estudios han encontrado una relación inversa entre la edad masculina y el conteo de espermatozoides, (Bartolacci et al., 2018)(Albert et al., 2015), y dos estudios recientes encontraron una disminución significativa en el conteo de espermatozoides a partir de los 41 y 41,5 años (Halvaei et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, la infertilidad masculina tiene muchas causas y, por lo tanto, los pacientes pueden presentar varias de ellas, por consecuencia aumentan los casos de infertilidad. Por lo que se recomienda que en la población estudiada deba caracterizarse adecuadamente para evaluar las condiciones posiblemente asociadas con un excesivo estrés oxidativo u algunas otras causas.

9.2 Impacto de la fragmentación del ADN espermático en la fertilidad (Embarazo y Tecnología de reproducción asistida)

Se reconoce que la integridad del ADN espermático es indispensable para el nacimiento de una descendencia sana (Krawetz, 2005). Por lo que la evidencia acumulada sugiere que la integridad del ADN espermático es esencial para la transmisión precisa de la información genética, y cualquier forma de daño en el ADN espermático puede provocar infertilidad masculina cuando los niveles de daño en el ADN son altos (González-Marín et al., 2012; Agarwal et al., 2016; Aitken & Curry, 2011; Bui et al., 2018; Rima et al., 2016).

A pesar de este hecho, a menudo se descuida a la pareja masculina durante la evaluación y el tratamiento de la infertilidad (Petok, 2015). Un aspecto crítico se relaciona con el hecho de que la causa de la infertilidad masculina permanece sin explicación en hasta el 60 % de los pacientes que utilizan las evaluaciones clásicas (Houston et al., 2021).

El análisis de semen es una de las investigaciones más importantes en la evaluación del potencial de fertilidad masculina porque proporciona una medida global de la función testicular y del epidídimo, la permeabilidad de los vasos y la función de las glándulas sexuales accesorias. Sin embargo, sin restarle importancia a las guías de la OMS para la estandarización y evaluación del semen, la interpretación

diagnóstica del análisis seminal sigue estando sujeta a investigación (Pandruvada et al., 2021)

El manual de análisis de semen de la OMS de 2010 ha informado valores de referencia basados en evidencia para los parámetros del semen, y uno de los aspectos notables de los límites de los parámetros del semen de la OMS de 2010 es que son más bajos que los informados en los manuales anteriores de la OMS (Barratt et al., 2017). La evaluación del volumen de semen, el conteo de espermatozoides, la motilidad de los espermatozoides y la morfología de los espermatozoides rara vez proporciona información discriminatoria sólida sobre el potencial de fertilidad masculina, a menos que sea en niveles extremadamente bajos. Por lo tanto es probable que un gran número de parejas previamente diagnosticadas con infertilidad por factor masculino ahora se clasifiquen con infertilidad inexplicable (con normozoospermia) (Pandruvada et al., 2021) si los médicos confían únicamente en un seminograma para asignar un diagnóstico de infertilidad por factor masculino (Esteves et al., 2021).

Debido a que la fragmentación del ADN espermático tiene un impacto adverso en el potencial de fertilización de los espermatozoides varios estudios sugieren que el daño en el ADN espermático, podría influir negativamente no solo en las tasas de concepción natural, sino también las tasa de éxito de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) (Borini et al., 2006) (Agarwal et al., 2019).

Bungum y colaboradores (2007) mostraron que el valor de DFI de esperma por encima del 30% era el umbral para un margen notable en la tasa de concepción. Cuando el valor de DFI de esperma es superior al 30%, el embarazo natural y la tasa de éxito de la IIU son casi cero, lo que indica que SDF puede afectar la calidad del esperma a través de la tasa de éxito de la IIU.

De acuerdo a las investigaciones se ha encontrado una relación entre estos dos valores, a menor índice de fragmentación de ADN espermático mayor porcentaje de embarazo exitoso y viceversa. Esto se observó en el estudio de du Fossé y colaboradore (2020) mostrando que el aborto espontáneo aumentaba significativamente cuando la DFI era > 40%.

Debido a que la fragmentación del ADN espermático tiene un impacto adverso en el potencial de fertilización de los espermatozoides, para mejorar los resultados en un estudio de Horta y colaboradores (2020), demostraron experimentalmente que, a pesar de los altos niveles de SDF inducida, la fertilización por FIV puede ocurrir normalmente y la SDF puede corregirse con ovocitos de hembras más jóvenes, lo que permite un desarrollo embrionario normal. También reconoció que los espermatozoides recuperados de los testículos de hombres con SDF elevado en el semen puro podrían tener una mejor calidad de ADN que sus contrapartes eyaculadas (Comité de Práctica de la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva, 2015).

9.3 PRUEBAS DE FRAGMENTACION DEL ADN

De acuerdo a la guía “The Society for Translational Medicine” recomiendan realizar pruebas a parejas con (a) infertilidad inexplicable, (b) pérdida recurrente del embarazo (RPL), (c) pacientes varones con factores de riesgo (p. ej., estilo de vida inadecuado, exposición a sustancias tóxicas) y (d) después de una IIU inexplicable fallida, FIV o ICSI. El uso de estas pruebas se han utilizado para obtener un conocimiento más profundo sobre la calidad del espermatozoides, además de conocer la función crítica de la integridad del ADN espermático y para que el desarrollo embrionario sea saludable y así obtener un resultado exitoso. Por lo que incluir las pruebas de SDF podría ser clínicamente informativas para tomar una opción y mejorar los resultados de la IIU, la FIV y la ICSI(Ahmad et al., 2017).

En general, los métodos para evaluar el daño del ADN espermático se pueden agrupar en tres categorías: (I) ensayos que miden la fragmentación del ADN mediante la incorporación de sondas de ADN o nucleótidos modificados en el sitio de las roturas (**p. ej, TUNEL**); (II) ensayos que midan tanto las roturas existentes como las generadas tras la desnaturalización del ADN (**SCSA, SCD y Comet**); y (III) ensayos que miden indirectamente el nivel de compactación de la cromatina, es decir, la descondensación del núcleo (el azul de anilina y el azul de toluidina son métodos que evalúan la compactación de la cromatina (condensación) en lugar de la SDF).

Como se señaló anteriormente en los resultados, no todos los tipos de daño del ADN espermático se detectan con la misma prueba, aunque los resultados de la prueba SDF están interrelacionados en mayor o menor medida a través de las propiedades del ADN.

Entonces ¿Que prueba se debería incluir en el seminograma? La medición de SDF con SDC o Halosperm parece ser la más precisa y confiable, ya que la técnica permite analizar miles de células en un tiempo relativamente corto (los resultados pueden ser repetibles y consistentes en 45 minutos). Además, tener la capacidad de evaluar un gran número de células es otro medio para controlar las variaciones inter e intralaboratorio en los resultados de las pruebas. No se requiere equipo costoso, es fácil de realizar y el análisis de los resultados es simple.

Si bien es cierto que en la actualidad, sugerir un ensayo específico en preferencia a otro no parece ser lo mejor para los médicos y los pacientes hasta que se establezca un método estándar de oro, (Esteves et al., 2021) se puede implementar una segunda opción si los resultados arrojan un alto porcentaje de fragmentación para verificar el resultado. TUNEL parece ser la mejor segunda opción ya que en la literatura es la más utilizada (Grèze et al., 2019), por ser preciso y fiable (Ribeiro et al., 2017).

En la actualidad, el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), el etiquetado del extremo de la muesca de la desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP (TUNEL), la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) y la electroforesis en gel único (COMETA) son los métodos más utilizados para medir la Fragmentación del ADN espermático, y parecer haber una buena correlación entre las tres pruebas SDF más utilizadas: SCSA, TUNEL y SCD, aunque la evidencia no es inequívoca (Grèze et al., 2019).

No obstante sería muy deseable que todas las clínicas realizaran un ensayo aceptado a nivel mundial con un fuerte valor predictivo, en realidad, la elección del ensayo SDF en clínicas individuales a menudo depende de la disponibilidad de instrumentación, el personal capacitado y el costo del ensayo a realizar en términos de reactivos y tiempo de ejecución (Agarwal et al., 2016).

Finalmente debido a que se ha incrementado el número de parejas con infertilidad se necesita con urgencia el desarrollo de métodos sólidos para el diagnóstico de la infertilidad masculina, ya que el análisis de semen de rutina, para la investigación de la infertilidad, ha mostrado pocos avances a lo largo de los años(Barratt et al., 2017).

Por esta razón se necesita examinar críticamente los parámetros de semen convencionales, debido a que la infertilidad masculina al presentarse con mayor frecuencia y ser compleja, varios autores afirman y apoyan tomar en cuenta las pruebas de fragmentación del ADN y ser parte del diagnóstico rutinario de infertilidad masculina(Agarwal et al., 2019; Esteves et al., 2021(Ghadir et al., 2015), para comprender mejor la relevancia clínica de los parámetros de esperma en hombres con normozoospermia.

10. CONCLUSION

Se recopiló la información actualizada sobre todas las posibles causas que inducen la fragmentación del ADN espermático (SDF). A lo largo de los años se sigue reconociendo a las especies reactivas de oxígeno, apoptosis, como una de las principales causas de infertilidad masculina.

La fragmentación del ADN espermático es causa importante de infertilidad masculina, debido a que la integridad del ADN es fundamental para los procesos de fecundación, implantación y desarrollo de los embriones.

Las técnicas de reproducción asistida se ven comprometidas dependiendo de los altos niveles de fragmentación del ADN de los espermatozoides (DFI) ($\geq 30\%$) se han asociado con un mal resultado del proceso de fertilización y por ende en el logro de un embarazo tanto natural como in vitro ya que el éxito de estas técnicas radica en la integridad estructural y funcional de los gametos.

Los defectos en la cromatina del espermatozoide traen resultados negativos en las técnicas de FIV/ICSI dando lugar a embriones de mala calidad y aborto. Se registró que el aborto espontáneo aumentaba significativamente cuando la DFI era $> 40\%$.

Debido al incremento en el número de parejas con infertilidad se hace necesario realizar las pruebas de Fragmentación del ADN del espermatozoide humano ya que el análisis seminal no determina la calidad del ADN de los espermatozoides.

La prueba SDF es un indicador más preciso del estado de fertilidad masculina, ya que analiza el genoma paterno. La integridad del ADN del esperma se considera vital para la fertilización normal, el desarrollo del embrión, la implantación exitosa y el éxito del embarazo tanto en reproducción natural como asistida.

Implementar las pruebas de SDF en la clínica mejorarían los resultados de la Tecnología de reproducción asistida y mejoraría la salud tanto de los futuros padres como la de los hijos resultantes.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, R. K., Ranga, G., & Li, J. (2008). Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and Sterility*, *89*(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.01.166>
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, *5*(6), 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
- Agarwal, A., Parekh, N., Selvam, M. K. P., Henkel, R., Shah, R., Homa, S. T., Ramasamy, R., Ko, E., Tremellen, K., Esteves, S., Majzoub, A., Alvarez, J. G., Gardner, D. K., Jayasena, C. N., Ramsay, J. W., Cho, C. L., Saleh, R., Sakkas, D., Hotaling, J. M., ... Harlev, A. (2019). Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 37, Issue 3, pp. 296–312). Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190055>
- Ahmad, G., Agarwal, A., Ahmad, G., & Agarwal, A. (2017). Ionizing Radiation and Male Fertility. *Male Infertility: A Clinical Approach*, 185–196. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3604-7_12
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, *84*(10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/MRD.22871>
- Aitken, R. J., & Curry, B. J. (2011). Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(3), 367–381. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3186>
- Akang, E., Oremosu, A., Osinubi, A., James, A., Biose, I., Dike, S., & Idoko, K.

(2017). Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 16(1), 53–53.

<https://go.gale.com/ps/i.do?p=HRCA&sw=w&issn=15962393&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA500783616&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>

Albert, B. B., De Bock, M., Derraik, J. G. B., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Hofman, P. L., & Cutfield, W. S. (2015). Increasing parental age at childbirth is associated with greater insulin sensitivity and more favorable metabolic profile in overweight adult male offspring. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 27(3), 380–386.

<https://doi.org/10.1002/ajhb.22654>

ALFERT, M. (1956). Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(2), 109–114. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.2.109>

Alshahrani, S., Agarwal, A., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Durairajanayagam, D., Ayaz, A., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-103>

Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C. I., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., & Messinis, I. E. (2014). The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm(®). *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(4), 777–782. <https://doi.org/10.1007/S00404-014-3281-X>

Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M., & Carrell, D. T. (2005). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology*, 26(6), 741–748. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05063>

Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. K. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(4), 505–514. <https://doi.org/10.1530/REP.1.00531>

- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., John, B. S., Sigman, M., Sokol, R., & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, 23(6), 660–680. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Brooks, H. L., & Yuan, J. X.-J. (2020). Función del sistema reproductor masculino. In *Ganong Fisiología médica, 26a*. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1175918270>
- Bartolacci, A., Pagliardini, L., Makieva, S., Salonia, A., Papaleo, E., & Viganò, P. (n.d.). *Abnormal sperm concentration and motility as well as advanced paternal age compromise early embryonic development but not pregnancy outcomes: a retrospective study of 1266 ICSI cycles*. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1256-8>
- Belloc, S., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, M., Dalleac, A., Amar, E., & Zini, A. (2014). Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and Sterility*, 101(6), 1588–1593. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.006>
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 14(8), 470–485. <https://doi.org/10.1038/NRUROL.2017.69>
- Bizarro Nevares, P., Acevedo Nava, S., & Herrera Enríquez, M. (2017). Aparato reproductor masculino. In D. T. I. Fortoul van der Goes (Ed.), *Histología y biología celular, 3e*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1138473836>

- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006). Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, *21*(11), 2876–2881. <https://doi.org/10.1093/humrep/del251>
- Bui, A. D., Sharma, R., Henkel, R., & Agarwal, A. (2018). Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*, *50*(8), e13012. <https://doi.org/10.1111/and.13012>
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, *22*(1), 174–179. <https://doi.org/10.1093/humrep/del326>
- Cai, H., Qin, D., & Peng, S. (2021). Responses and coping methods of different testicular cell types to heat stress: overview and perspectives. *Bioscience Reports*, *41*(6), 20210443. <https://doi.org/10.1042/BSR20210443>
- Cissen, M., Van Wely, M., Scholten, I., Mansell, S., De Bruin, J. P., Mol, B. W., Braat, D., Repping, S., & Hamer, G. (2016). Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, *11*(11), e0165125. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165125>
- du Fossé, N. A., van der Hoorn, M. L. P., van Lith, J. M. M., le Cessie, S., & Lashley, E. E. L. O. (2020). Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *26*(5), 650–669. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa010>
- Eini, F., Kutenaeei, M. A., Zareei, F., Dastjerdi, Z. S., Shirzeyli, M. H., & Salehi, E. (2021). Effect of bacterial infection on sperm quality and DNA fragmentation in subfertile men with Leukocytospermia. *BMC Molecular and Cell Biology*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/S12860-021-00380-8>

- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, *53*(2), 1–41. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
- Evans, E. P. P., Scholten, J. T. M., Mzyk, A., Reyes-San-Martin, C., Llumbet, A. E., Hamoh, T., Arts, E. G. J. M., Schirhagl, R., & Cantineau, A. E. P. (2021). Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biology*, *46*. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.102071>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2 Suppl), 532–537. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2005.03.021>
- Fang, Y., Su, Y., Xu, J., Hu, Z., Zhao, K., Liu, C., & Zhang, H. (2021). Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.729539>
- Finelli, R., Pallotti, F., Cargnelutti, F., Faja, F., Carlini, T., Rizzo, F., Lenzi, A., Paoli, D., & Lombardo, F. (2021). Sperm DNA damage and cytokines in varicocele: A case-control study. *Andrologia*, *53*(5). <https://doi.org/10.1111/AND.14023>
- Francis, S., Yelumalai, S., Jones, C., & Coward, K. (2014). Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Human Fertility (Cambridge, England)*, *17*(2), 80–89. <https://doi.org/10.3109/14647273.2014.915347>
- Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., Goyanes, V., Gosálvez, J., & Fernández, J. L. (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertility and Sterility*, *90*(2), 328–334. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.06.035>
- Ghadir, S., Ambartsumyan, G., & DeCherney, A. H. (2015). Infertilidad. In A. H. DeCherney, L. Nathan, N. Laufer, & A. S. Roman (Eds.), *Diagnóstico y*

tratamiento ginecoobstétricos, 11e. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1120413376>

Gill, K., Kups, M., Harasny, P., Machalowski, T., Grabowska, M., Lukaszuk, M., Matuszewski, M., Duchnik, E., Fraczek, M., Kurpisz, M., & Piasecka, M. (2021). The Negative Impact of Varicocele on Basic Semen Parameters, Sperm Nuclear DNA Dispersion and Oxidation-Reduction Potential in Semen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/IJERPH18115977>

Góngora-Rodríguez, A., & Fontanilla-Ramírez, D. (2010). Revisión de tema LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO, INFLUENCIA SOBRE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y LA CALIDAD EMBRIONARIA The influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(•), 160–164. <http://www.pubmed.com>

Gosálvez, J., Vázquez, J. M., Enciso, M., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Bridle, J. R., & López-Fernández, C. (2014). Sperm DNA Fragmentation in Rams Vaccinated with Miloxan. *The Open Veterinary Science Journal*, 2(1), 7–10. <https://doi.org/10.2174/1874318808002010007>

Grèze, C., Guttman, A., Pons-Rejraji, H., Vasson, M. P., Lornage, J., Ouchchane, L., & Brugnon, F. (2019). Can the SCD test and terminal uridine nick-end labeling by flow cytometry technique (TUNEL/FCM) be used interchangeably to measure sperm DNA damage in routine laboratory practice? *Basic and Clinical Andrology*, 29(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0098-2>

Halvaei, I., Litzky, J., & Esfandiari, N. (2020). Advanced paternal age: effects on sperm parameters, assisted reproduction outcomes and offspring health. *Reproductive Biology and Endocrinology 2020 18:1*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12958-020-00668-Y>

Hamilton, T. R. dos S., & Assumpção, M. E. O. D. (2020). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, 28(1), 1–8.

<https://doi.org/DOI: 10.1017/S0967199419000595>

Hans, B. Y. (1948). *The state of the chromosomes in the interfase nucleus*.

Hao, S.-L., Ni, F.-D., & Yang, W.-X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, *706*, 201–210.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>

Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W. B., & Kruger, T. F. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, *81*(4), 965–972. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.09.044>

Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Halvorson, L. M., Hamid, C. A., Corton, M. M., & Schaffer, J. I. (2020). Valoración de la pareja estéril. In *Williams Ginecología, 4e*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1178949694>

Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., Vollenhoven, B., & Temple-Smith, P. (2020). Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *35*(3), 529–544. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez308>

Houston, B. J., Riera-Escamilla, A., Wyrwoll, M. J., Salas-Huetos, A., Xavier, M. J., Nagirnaja, L., Friedrich, C., Conrad, D. F., Aston, K. I., Krausz, C., Tüttelmann, F., O'Bryan, M. K., Veltman, J. A., & Oud, M. S. (2021). A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene–disease relationships. *Human Reproduction Update*, *28*(1), 15–29. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab030>

Kleshchev, M., Osadchuk, A., & Osadchuk, L. (2021). Impaired semen quality, an increase of sperm morphological defects and DNA fragmentation associated with environmental pollution in urban population of young men from Western Siberia, Russia. *PLoS ONE*, *16*(10), e0258900.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0258900>

- Komsky-Elbaz, A., Saksier, M., & Roth, Z. (2018). Aflatoxin B1 impairs sperm quality and fertilization competence. *Toxicology*, 393, 42–50.
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2017.11.007>
- Krawetz, S. A. (2005). Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 633–642. <https://doi.org/10.1038/nrg1654>
- LEUCHTENBERGER, C., SCHRADER, F., WEIR, D. R., & GENTILE, D. P. (1953). The desoxyribosenucleic acid (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males. *Chromosoma*, 6(1), 61–78.
<https://doi.org/10.1007/BF01259931>
- Li, Y., Sheng, J., Sha, J., & Han, X. D. (2008). The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N. Y.)*, 26(3–4), 239–245.
<https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2008.09.004>
- Mínguez-Alarcón, L., Gaskins, A. J., Chiu, Y.-H., Messerlian, C., Williams, P. L., Ford, J. B., Souter, I., Hauser, R., & Chavarro, J. E. (2018). Type of underwear worn and markers of testicular function among men attending a fertility center. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(9), 1749–1756.
<https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEY259>
- Molina, P. E. (2015). Aparato reproductor masculino. In H. Raff & M. Levitzky (Eds.), *Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas*. McGraw-Hill Education.
<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1118400637>
- Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. *International Journal of Andrology*, 25(5), 255–261. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2605.2002.00372.X>
- Mostafa, R. M., Nasrallah, Y. S., Hassan, M. M., Farrag, A. F., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018). The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*, 50(3).
<https://doi.org/10.1111/AND.12910>

- Nanassy, L., Liu, L., Griffin, J., & Carrell, D. T. (2011). The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein and Peptide Letters*, 18(8), 772–777. <https://doi.org/10.2174/092986611795713934>
- Oghbaei, H., Rastgar Rezaei, Y., Nikanfar, S., Zarezadeh, R., Sadegi, M., Latifi, Z., Nouri, M., Fattahi, A., Ahmadi, Y., & Bleisinger, N. (2020). Effects of bacteria on male fertility: Spermatogenesis and sperm function. *Life Sciences*, 256. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117891>
- Oleszczuk, K., Oleszczuk, K., Giwercman, A., & Bungum, M. (2016). *Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome*. <https://doi.org/10.1111/andr.12153>
- Pacey, A. (2018). Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 53, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2018.09.003>
- Panamericana (Ed.). (2017). *Embriología Humana y Biología del desarrollo* (1ra Edición).
- Pandruvada, S., Royfman, R., Shah, T. A., Sindhvani, P., Dupree, J. M., Schon, S., & Avidor-Reiss, T. (2021). Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(2), 265–276. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02037-5>
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., & Saéz, F. J. (2017). Gametogénesis y fecundación. In *Biología celular y molecular*, 4e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1146931542>
- Paul, C., Murray, A. A., Spears, N., & Saunders, P. T. K. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136(1), 73–84. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0036>

- Petok, W. D. (2015). Infertility counseling (or the lack thereof) of the forgotten male partner. *Fertility and Sterility*, 104(2), 260–266.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.040>
- Pollister, A. W., & Mirsky, A. E. (1946). THE NUCLEOPROTAMINE OF TROUT SPERM. *The Journal of General Physiology*, 30(2), 101–116.
<https://doi.org/10.1085/jgp.30.2.101>
- Portella, J. R., & Gonzales, G. F. (2016). *Sperm DNA fragmentation: origin, evaluation and impact in male fertility matematica funcional para educacion especial View project Cryopreservation of spermatogonia stem cell in Lama Vicugna pacos View project*.
<https://www.researchgate.net/publication/311733818>
- Pradeepa, M. M., & Rao, M. R. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63(FEBRUARY 2007), 1–10.
- Puga Molina, L. C., Oliveira, P. F., Alves, M. G., & Martin-Hidalgo, D. (2021). Assisted reproductive technology outcomes in obese and diabetic men: lighting the darkness. *F&S Reviews*, 2(4), 317–329.
<https://doi.org/10.1016/J.XFNR.2021.09.002>
- Quintero-Vásquez, G. A., Bermúdez-Cruz, R. M., & Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad Masculina Y Fragmentación Del Adn Espermático: Un Problema Actual. *Tip*, 18(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>
- Rex, A. S., Aagaard, J., & Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*, 5(4), 622. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12381>
- Ribeiro, S. C., Muratori, M., De Geyter, M., & De Geyter, C. (2017). TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS ONE*, 12(8), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181802>

- Rima, D., Shiv, B. K., Bhavna, C., Shilpa, B., & Saima, K. (2016). Oxidative Stress Induced Damage to Paternal Genome and Impact of Meditation and Yoga - Can it Reduce Incidence of Childhood Cancer? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 17(9), 4517–4525.
- Ringertz, N. R., Gledhill, B. L., & Darzynkiewicz, Z. (1970). Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Sensitivity of DNA to heat denaturation. *Experimental Cell Research*, 62(1), 204–218.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90521-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90521-4)
- Samplaski, M. K., Dimitromanolakis, A., Lo, K. C., Grober, E. D., Mullen, B., Garbens, A., & Jarvi, K. A. (2015). The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0035-Y/TABLES/4>
- Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 2.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- Searle, A. G., & Beechey, C. V. (1974). Sperm-count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutation Research*, 22(1), 63–72.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(74\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(74)90009-8)
- Selvam, Agarwal, Pushparaj, Baskaran, & Bendou. (2019). Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes*, 10(7), 522. <https://doi.org/10.3390/genes10070522>
- Serna, N. L. (2015). Gametogénesis y espermatogénesis. In *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Education.
<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1115012696>
- Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., Schlegel, P. N., Howards, S. S., Nehra, A., Damewood, M. D., Overstreet, J. W., & Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77(5), 873–882. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03105-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03105-9)

- Sigman, M., & Jarow, J. P. (1997). Endocrine evaluation of infertile men. *Urology*, *50*(5), 659–664. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00340-3)
- Smit, M., Van Casteren, N. J., Wildhagen, M. F., Romijn, J. C., & Dohle, G. R. (2010). Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *25*(8), 1877–1883. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEQ104>
- Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000a). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, *73*(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00462-8)
- Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000b). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, *73*(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00462-8)
- Tanrikut, C., Feldman, A. S., Altemus, M., Paduch, D. A., & Schlegel, P. N. (2010). Adverse effect of paroxetine on sperm. *Fertility and Sterility*, *94*(3), 1021–1026. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.04.039>
- Viviana Álvarez Gonçalves, C., Arellano, F. E., Leopoldo, A., & Carrera, P. (n.d.). *TÉCNICAS DE ESTUDIO PARA LA EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL STUDY TECHNIQUES FOR THE EVALUATION OF DNA DAMAGE AND ITS APPLICATION IN ANIMAL PRODUCTION Resúmen.*
- Vončina, S. M., Stenqvist, A., Bungum, M., Schyman, T., & Giwercman, A. (2021). Sperm DNA fragmentation index and cumulative live birth rate in a cohort of 2,713 couples undergoing assisted reproduction treatment. *Fertility and Sterility*, *116*(6), 1483–1490. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2021.06.049>
- Wallach, E. E., Editor, A., Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and

analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036.

<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.10.046>

Walsh, T. J., & Smith, J. F. (2015). Infertilidad masculina. In J. W. McAninch & T. F. Lue (Eds.), *Smith y Tanagho. Urología general, 18e*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1119291108>

Williamson, R. (1970). Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *Journal of Molecular Biology*, 51(1), 157–168.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90277-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90277-9)

Agarwal, A., Deepinder, F., Sharma, R. K., Ranga, G., & Li, J. (2008). Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and Sterility*, 89(1), 124–128.

<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.01.166>

Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: Practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 5(6), 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>

Agarwal, A., Parekh, N., Selvam, M. K. P., Henkel, R., Shah, R., Homa, S. T., Ramasamy, R., Ko, E., Tremellen, K., Esteves, S., Majzoub, A., Alvarez, J. G., Gardner, D. K., Jayasena, C. N., Ramsay, J. W., Cho, C. L., Saleh, R., Sakkas, D., Hotaling, J. M., ... Harlev, A. (2019). Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. In *World Journal of Men's Health* (Vol. 37, Issue 3, pp. 296–312). Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190055>

Ahmad, G., Agarwal, A., Ahmad, G., & Agarwal, A. (2017). Ionizing Radiation and Male Fertility. *Male Infertility: A Clinical Approach*, 185–196.

https://doi.org/10.1007/978-81-322-3604-7_12

Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84(10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/MRD.22871>

Aitken, R. J., & Curry, B. J. (2011). Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(3), 367–381. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3186>

Akang, E., Oremosu, A., Osinubi, A., James, A., Biose, I., Dike, S., & Idoko, K. (2017). Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 16(1), 53–53. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=HRCA&sw=w&issn=15962393&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA500783616&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>

Albert, B. B., De Bock, M., Derraik, J. G. B., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Hofman, P. L., & Cutfield, W. S. (2015). Increasing parental age at childbirth is associated with greater insulin sensitivity and more favorable metabolic profile in overweight adult male offspring. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 27(3), 380–386. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22654>

ALFERT, M. (1956). Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(2), 109–114. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.2.109>

Alshahrani, S., Agarwal, A., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Durairajanayagam, D., Ayaz, A., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-103>

Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C. I., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., & Messinis, I. E. (2014). The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on

sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®). *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(4), 777–782. <https://doi.org/10.1007/S00404-014-3281-X>

- Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M., & Carrell, D. T. (2005). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology*, 26(6), 741–748. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05063>
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. K. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(4), 505–514. <https://doi.org/10.1530/REP.1.00531>
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Martini, F. O., McLachlan, R., Oates, R. D., van der Poel, S., John, B. S., Sigman, M., Sokol, R., & Tournaye, H. (2017). The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Human Reproduction Update*, 23(6), 660–680. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021>
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Brooks, H. L., & Yuan, J. X.-J. (2020). Función del sistema reproductor masculino. In *Ganong Fisiología médica, 26a*. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1175918270>
- Bartolacci, A., Pagliardini, L., Makieva, S., Salonia, A., Papaleo, E., & Viganò, P. (n.d.). *Abnormal sperm concentration and motility as well as advanced paternal age compromise early embryonic development but not pregnancy outcomes: a retrospective study of 1266 ICSI cycles*. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1256-8>
- Belloc, S., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, M., Dalleac, A., Amar, E., & Zini, A. (2014). Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and Sterility*, 101(6), 1588–1593. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.006>
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J.

- F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 14(8), 470–485. <https://doi.org/10.1038/NRUROL.2017.69>
- Bizarro Nevares, P., Acevedo Nava, S., & Herrera Enríquez, M. (2017). Aparato reproductor masculino. In D. T. I. Fortoul van der Goes (Ed.), *Histología y biología celular*, 3e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1138473836>
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006). Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, 21(11), 2876–2881. <https://doi.org/10.1093/humrep/del251>
- Bui, A. D., Sharma, R., Henkel, R., & Agarwal, A. (2018). Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*, 50(8), e13012. <https://doi.org/10.1111/and.13012>
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, 22(1), 174–179. <https://doi.org/10.1093/humrep/del326>
- Cai, H., Qin, D., & Peng, S. (2021). Responses and coping methods of different testicular cell types to heat stress: overview and perspectives. *Bioscience Reports*, 41(6), 20210443. <https://doi.org/10.1042/BSR20210443>
- Cissen, M., Van Wely, M., Scholten, I., Mansell, S., De Bruin, J. P., Mol, B. W., Braat, D., Repping, S., & Hamer, G. (2016). Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(11), e0165125. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165125>

- du Fossé, N. A., van der Hoorn, M. L. P., van Lith, J. M. M., le Cessie, S., & Lashley, E. E. L. O. (2020). Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 26(5), 650–669. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa010>
- Eini, F., Kutenaei, M. A., Zareei, F., Dastjerdi, Z. S., Shirzeyli, M. H., & Salehi, E. (2021). Effect of bacterial infection on sperm quality and DNA fragmentation in subfertile men with Leukocytospermia. *BMC Molecular and Cell Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12860-021-00380-8>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), 1–41. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
- Evans, E. P. P., Scholten, J. T. M., Mzyk, A., Reyes-San-Martin, C., Llumbet, A. E., Hamoh, T., Arts, E. G. J. M., Schirhagl, R., & Cantineau, A. E. P. (2021). Male subfertility and oxidative stress. *Redox Biology*, 46. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.102071>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 Suppl), 532–537. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2005.03.021>
- Fang, Y., Su, Y., Xu, J., Hu, Z., Zhao, K., Liu, C., & Zhang, H. (2021). Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.729539>
- Finelli, R., Pallotti, F., Cargnelutti, F., Faja, F., Carlini, T., Rizzo, F., Lenzi, A., Paoli, D., & Lombardo, F. (2021). Sperm DNA damage and cytokines in varicocele: A case-control study. *Andrologia*, 53(5). <https://doi.org/10.1111/AND.14023>
- Francis, S., Yelumalai, S., Jones, C., & Coward, K. (2014). Aberrant protamine

content in sperm and consequential implications for infertility treatment.

Human Fertility (Cambridge, England), 17(2), 80–89.

<https://doi.org/10.3109/14647273.2014.915347>

Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., Goyanes, V., Gosálvez, J., & Fernández, J.

L. (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertility and Sterility*, 90(2), 328–334. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.06.035>

Ghadir, S., Ambartsumyan, G., & DeCherney, A. H. (2015). Infertilidad. In A. H. DeCherney, L. Nathan, N. Laufer, & A. S. Roman (Eds.), *Diagnóstico y tratamiento ginecoobstétricos*, 11e. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1120413376>

Gill, K., Kups, M., Harasny, P., Machalowski, T., Grabowska, M., Lukaszuk, M.,

Matuszewski, M., Duchnik, E., Fraczek, M., Kurpisz, M., & Piasecka, M.

(2021). The Negative Impact of Varicocele on Basic Semen Parameters, Sperm Nuclear DNA Dispersion and Oxidation-Reduction Potential in Semen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11).

<https://doi.org/10.3390/IJERPH18115977>

Góngora-Rodríguez, A., & Fontanilla-Ramírez, D. (2010). Revisión de tema LA FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO, INFLUENCIA SOBRE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y LA CALIDAD EMBRIONARIA

The influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(•), 160–164. <http://www.pubmed.com>

<http://www.pubmed.com>

Gosálvez, J., Vázquez, J. M., Enciso, M., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Bridle, J.

R., & López-Fernández, C. (2014). Sperm DNA Fragmentation in Rams Vaccinated with Miloxan. *The Open Veterinary Science Journal*, 2(1), 7–10.

<https://doi.org/10.2174/1874318808002010007>

Grèze, C., Guttman, A., Pons-Rejraji, H., Vasson, M. P., Lornage, J., Ouchchane,

L., & Brugnon, F. (2019). Can the SCD test and terminal uridine nick-end

- labeling by flow cytometry technique (TUNEL/FCM) be used interchangeably to measure sperm DNA damage in routine laboratory practice? *Basic and Clinical Andrology*, 29(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0098-2>
- Halvaei, I., Litzky, J., & Esfandiari, N. (2020). Advanced paternal age: effects on sperm parameters, assisted reproduction outcomes and offspring health. *Reproductive Biology and Endocrinology 2020 18:1*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12958-020-00668-Y>
- Hamilton, T. R. dos S., & Assumpção, M. E. O. D. (2020). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, 28(1), 1–8. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0967199419000595>
- Hans, B. Y. (1948). *The state of the chromosomes in the interfase nucleus*.
- Hao, S.-L., Ni, F.-D., & Yang, W.-X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201–210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W. B., & Kruger, T. F. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, 81(4), 965–972. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.09.044>
- Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Halvorson, L. M., Hamid, C. A., Corton, M. M., & Schaffer, J. I. (2020). Valoración de la pareja estéril. In *Williams Ginecología*, 4e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1178949694>
- Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., Vollenhoven, B., & Temple-Smith, P. (2020). Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 35(3), 529–544. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez308>
- Houston, B. J., Riera-Escamilla, A., Wyrwoll, M. J., Salas-Huetos, A., Xavier, M. J., Nagirnaja, L., Friedrich, C., Conrad, D. F., Aston, K. I., Krausz, C., Tüttelmann,

- F., O'Bryan, M. K., Veltman, J. A., & Oud, M. S. (2021). A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene–disease relationships. *Human Reproduction Update*, 28(1), 15–29. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab030>
- Kleshchev, M., Osadchuk, A., & Osadchuk, L. (2021). Impaired semen quality, an increase of sperm morphological defects and DNA fragmentation associated with environmental pollution in urban population of young men from Western Siberia, Russia. *PLoS ONE*, 16(10), e0258900. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0258900>
- Komsky-Elbaz, A., Saktsier, M., & Roth, Z. (2018). Aflatoxin B1 impairs sperm quality and fertilization competence. *Toxicology*, 393, 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2017.11.007>
- Krawetz, S. A. (2005). Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 633–642. <https://doi.org/10.1038/nrg1654>
- LEUCHTENBERGER, C., SCHRADER, F., WEIR, D. R., & GENTILE, D. P. (1953). The desoxyribosenucleic acid (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males. *Chromosoma*, 6(1), 61–78. <https://doi.org/10.1007/BF01259931>
- Li, Y., Sheng, J., Sha, J., & Han, X. D. (2008). The toxic effects of microcystin-LR on the reproductive system of male rats in vivo and in vitro. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(3–4), 239–245. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2008.09.004>
- Mínguez-Alarcón, L., Gaskins, A. J., Chiu, Y.-H., Messerlian, C., Williams, P. L., Ford, J. B., Souter, I., Hauser, R., & Chavarro, J. E. (2018). Type of underwear worn and markers of testicular function among men attending a fertility center. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(9), 1749–1756. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEY259>
- Molina, P. E. (2015). Aparato reproductor masculino. In H. Raff & M. Levitzky (Eds.), *Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas*. McGraw-Hill

Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1118400637>

- Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. *International Journal of Andrology*, 25(5), 255–261. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2605.2002.00372.X>
- Mostafa, R. M., Nasrallah, Y. S., Hassan, M. M., Farrag, A. F., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018). The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/AND.12910>
- Nanassy, L., Liu, L., Griffin, J., & Carrell, D. T. (2011). The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein and Peptide Letters*, 18(8), 772–777. <https://doi.org/10.2174/092986611795713934>
- Oghbaei, H., Rastgar Rezaei, Y., Nikanfar, S., Zarezadeh, R., Sadegi, M., Latifi, Z., Nouri, M., Fattahi, A., Ahmadi, Y., & Bleisinger, N. (2020). Effects of bacteria on male fertility: Spermatogenesis and sperm function. *Life Sciences*, 256. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117891>
- Oleszczuk, K., Oleszczuk, K., Giwercman, A., & Bungum, M. (2016). *Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome*. <https://doi.org/10.1111/andr.12153>
- Pacey, A. (2018). Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 53, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2018.09.003>
- Panamericana (Ed.). (2017). *Embriología Humana y Biología del desarrollo* (1ra Edición).
- Pandruvada, S., Royfman, R., Shah, T. A., Sindhwani, P., Dupree, J. M., Schon, S., & Avidor-Reiss, T. (2021). Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*,

38(2), 265–276. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02037-5>

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., & Saéz, F. J. (2017). Gametogénesis y fecundación. In *Biología celular y molecular, 4e*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1146931542>

Paul, C., Murray, A. A., Spears, N., & Saunders, P. T. K. (2008). A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, *136*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0036>

Petok, W. D. (2015). Infertility counseling (or the lack thereof) of the forgotten male partner. *Fertility and Sterility*, *104*(2), 260–266.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.040>

Pollister, A. W., & Mirsky, A. E. (1946). THE NUCLEOPROTAMINE OF TROUT SPERM. *The Journal of General Physiology*, *30*(2), 101–116.

<https://doi.org/10.1085/jgp.30.2.101>

Portella, J. R., & Gonzales, G. F. (2016). *Sperm DNA fragmentation: origin, evaluation and impact in male fertility matemática funcional para educación especial View project Cryopreservation of spermatogonia stem cell in Lama Vicugna pacos View project*.

<https://www.researchgate.net/publication/311733818>

Pradeepa, M. M., & Rao, M. R. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *63*(FEBRUARY 2007), 1–10.

Puga Molina, L. C., Oliveira, P. F., Alves, M. G., & Martin-Hidalgo, D. (2021). Assisted reproductive technology outcomes in obese and diabetic men: lighting the darkness. *F&S Reviews*, *2*(4), 317–329.

<https://doi.org/10.1016/J.XFNR.2021.09.002>

- Quintero-Vásquez, G. A., Bermúdez-Cruz, R. M., & Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad Masculina Y Fragmentación Del Adn Espermático: Un Problema Actual. *Tip*, 18(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>
- Rex, A. S., Aagaard, J., & Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*, 5(4), 622. <https://doi.org/10.1111/ANDR.12381>
- Ribeiro, S. C., Muratori, M., De Geyter, M., & De Geyter, C. (2017). TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLoS ONE*, 12(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181802>
- Rima, D., Shiv, B. K., Bhavna, C., Shilpa, B., & Saima, K. (2016). Oxidative Stress Induced Damage to Paternal Genome and Impact of Meditation and Yoga - Can it Reduce Incidence of Childhood Cancer? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 17(9), 4517–4525.
- Ringertz, N. R., Gledhill, B. L., & Darzynkiewicz, Z. (1970). Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Sensitivity of DNA to heat denaturation. *Experimental Cell Research*, 62(1), 204–218. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90521-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90521-4)
- Samplaski, M. K., Dimitromanolakis, A., Lo, K. C., Grober, E. D., Mullen, B., Garbens, A., & Jarvi, K. A. (2015). The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0035-Y/TABLES/4>
- Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 2. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- Searle, A. G., & Beechey, C. V. (1974). Sperm-count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutation Research*, 22(1), 63–72. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(74\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(74)90009-8)
- Selvam, Agarwal, Pushparaj, Baskaran, & Bendou. (2019). Sperm Proteome

Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes*, 10(7), 522. <https://doi.org/10.3390/genes10070522>

Serna, N. L. (2015). Gametogénesis y espermatogénesis. In *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1115012696>

Sharlip, I. D., Jarow, J. P., Belker, A. M., Lipshultz, L. I., Sigman, M., Thomas, A. J., Schlegel, P. N., Howards, S. S., Nehra, A., Damewood, M. D., Overstreet, J. W., & Sadovsky, R. (2002). Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility*, 77(5), 873–882. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03105-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03105-9)

Sigman, M., & Jarow, J. P. (1997). Endocrine evaluation of infertile men. *Urology*, 50(5), 659–664. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00340-3)

Smit, M., Van Casteren, N. J., Wildhagen, M. F., Romijn, J. C., & Dohle, G. R. (2010). Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(8), 1877–1883. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEQ104>

Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000a). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, 73(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00462-8)

Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000b). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*, 73(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00462-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00462-8)

Tanrikut, C., Feldman, A. S., Altemus, M., Paduch, D. A., & Schlegel, P. N. (2010). Adverse effect of paroxetine on sperm. *Fertility and Sterility*, 94(3), 1021–1026. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.04.039>

Viviana Álvarez Gonçalves, C., Arellano, F. E., Leopoldo, A., & Carrera, P. (n.d.). *TÉCNICAS DE ESTUDIO PARA LA EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y SU*

APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL STUDY TECHNIQUES FOR THE EVALUATION OF DNA DAMAGE AND ITS APPLICATION IN ANIMAL PRODUCTION Resumen.

Vončina, S. M., Stenqvist, A., Bungum, M., Schyman, T., & Giwercman, A. (2021). Sperm DNA fragmentation index and cumulative live birth rate in a cohort of 2,713 couples undergoing assisted reproduction treatment. *Fertility and Sterility*, 116(6), 1483–1490.

<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2021.06.049>

Wallach, E. E., Editor, A., Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1027–1036.

<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.10.046>

Walsh, T. J., & Smith, J. F. (2015). Infertilidad masculina. In J. W. McAninch & T. F. Lue (Eds.), *Smith y Tanagho. Urología general, 18e*. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1119291108>

Williamson, R. (1970). Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *Journal of Molecular Biology*, 51(1), 157–168.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90277-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90277-9)