



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DOCUMENTAL Y BIOESTADÍSTICO DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN
MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN UNA CLÍNICA DE MEDICINA
REPRODUCTIVA EN GUAYAQUIL, ECUADOR**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del Título
de Ingeniera en Biotecnología*

AUTORA: MARÍA DE LOS ÁNGELES SÁNCHEZ CASTRO

TUTORAS: PhD. BRENDA PATRICIA LÓPEZ ULLOA

PhD. DAYSI TATIANA PUGA TORRES

Guayaquil- Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **María de los Ángeles Sánchez Castro** con documento de identificación N° 0956824270 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024.

Atentamente,



María de los Ángeles Sánchez Castro

C.I. 0956824270

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, **María de los Ángeles Sánchez Castro** con documento de identificación N° 0956824270 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024.

Atentamente,



María de los Ángeles Sánchez Castro

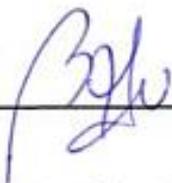
C.I. 0956824270

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Brenda Patricia López Ulloa**, con documento de identificación N° 0960450922 , docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **ANÁLISIS DOCUMENTAL Y BIOESTADÍSTICO DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN UNA CLÍNICA DE MEDICINA REPRODUCTIVA EN GUAYAQUIL, ECUADOR**, realizado por **María de los Ángeles Sánchez Castro** con documento de identificación N° 0956824270, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,



PhD. Brenda Patricia López Ulloa

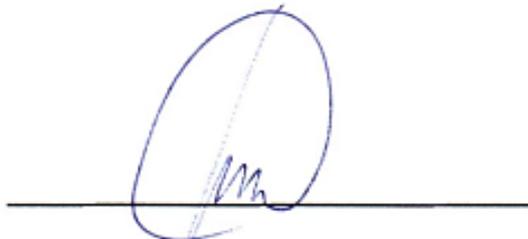
C.I. 0960450922

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Daysi Tatiana Puga Torres**, con documento de identificación N° 0919731281, colaboradora del Centro Nacional de Reproducción Asistida INNAIFEST S.A., declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **ANÁLISIS DOCUMENTAL Y BIOESTADÍSTICO DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN UNA CLÍNICA DE MEDICINA REPRODUCTIVA EN GUAYAQUIL, ECUADOR**, realizado por **María de los Ángeles Sánchez Castro** con documento de identificación N° 0956824270, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,



PhD. Daysi Tatiana Puga Torres

C.I. 0919731281

DEDICATORIA

Primero y, ante todo, agradezco a Dios por darme la fuerza y la sabiduría para superar cada desafío. Sin Su guía, este trabajo no hubiera sido posible.

A mi madre, quien ha sido mi roca, mi ejemplo y mi inspiración constante. Gracias por tus consejos, tu paciencia infinita, y por creer en mí incluso cuando yo misma no lo hacía.

A mi padre, por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Tus palabras y apoyo han sido un pilar fundamental en mi vida.

A mis hermanos, que, con su amor, sus risas y su compañía, han hecho de mi vida un lugar mejor. Gracias por estar a mi lado en cada paso del camino.

A mi sobrina, por ser la luz de mis días y recordarme siempre la importancia de la inocencia y la alegría.

A mis tíos y primos, quienes han sido una parte fundamental de mi vida, creando recuerdos inolvidables y estando presentes desde mi infancia. Su amor y apoyo han sido invaluable a lo largo de los años.

A mis reales, ustedes saben quiénes son. Gracias por su amistad, apoyo y por estar siempre ahí cuando más los he necesitado.

No podría olvidar a Benito Martínez, Alvarito Díaz y Gabriel Mora, quienes con su música me han acompañado en las largas noches de trabajo. Su arte ha sido la banda sonora de este proceso creativo.

Y como dijo Mora, "esta la hice en dos horas, no más por...", refiriéndose a que a veces, el proceso creativo es tan espontáneo y auténtico que el resultado puede parecer casual, pero es precisamente esa autenticidad la que le da valor. Este trabajo, como esa frase, ha sido un esfuerzo sincero y lleno de pasión.

A todos ustedes, gracias de corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica Salesiana, por brindarme el entorno académico y los recursos necesarios para completar mi formación. Su compromiso con la excelencia educativa ha sido fundamental para mi desarrollo académico y personal.

A mi tutora, Brenda López, por su apoyo incondicional y su ayuda experta a lo largo de todo el proceso. Su orientación y dedicación han sido cruciales para llevar este trabajo a buen término.

Al Centro Nacional de Reproducción Asistida INNAIFEST, por permitirme llevar a cabo este tema de investigación y por la oportunidad de adquirir conocimientos y experiencias valiosas en el ámbito profesional.

Agradezco profundamente el apoyo y la orientación brindados por el Dr. Xavier Blum y la Dra. Tatiana Puga, cuya experiencia, dedicación, amabilidad y confianza han sido invaluable para el éxito de este proyecto.

RESUMEN

La infertilidad es un problema de salud que afecta a una gran parte de la población mundial, y la evaluación morfológica de espermatozoides es crucial en el diagnóstico y tratamiento de esta condición. Aunque los métodos tradicionales basados en los parámetros de la OMS son ampliamente utilizados, pueden no ser suficientes para un diagnóstico preciso. En respuesta, la sexta edición del manual de laboratorio de la OMS (2021) ha recomendado la implementación de índices como el índice de teratozoospermia (TZI), el índice de anomalías múltiples (MAI) y el índice de deformidades espermáticas (SDI). Estos índices permiten una evaluación más detallada de los defectos espermáticos, ofreciendo una guía más precisa para la selección de tratamientos y técnicas de reproducción asistida.

Este estudio, de tipo retrospectivo, descriptivo, correlacional y comparativo, se realizó en una clínica de medicina reproductiva en Guayaquil, Ecuador, durante enero a mayo de 2024. Analiza la relación entre estos índices y otros parámetros seminales fundamentales, con el objetivo de determinar su relevancia y aplicabilidad en la medicina reproductiva. Se empleó una muestra de 30 pacientes, seleccionados mediante muestreo no probabilístico por conveniencia.

Los hallazgos resaltan la importancia de la morfología espermática en la evaluación de la calidad del semen y su impacto en la fertilidad masculina. Las correlaciones observadas entre los diferentes índices morfológicos y los parámetros seminales sugieren que las anomalías morfológicas, especialmente en el cuello del espermatozoide, pueden influir significativamente en la motilidad y capacidad fecundante. El índice MAI mostró correlaciones fuertes con anomalías en la cabeza y el cuello, sugiriendo que es el método más completo para una evaluación integral. Por otro lado, el TZI es eficaz en detectar anomalías en el cuello, pero su utilidad es limitada en otras áreas. El estudio también subraya la importancia de continuar investigando debido a la controversia en la literatura sobre la correlación entre la morfología espermática y otros parámetros seminales. A pesar de las limitaciones del estudio, como el corto periodo de análisis, los resultados ofrecen una base para mejorar los métodos de evaluación y la toma de decisiones clínicas.

Palabras clave: Infertilidad, Morfología espermática, TZI, MAI, SDI, Evaluación seminal, Reproducción asistida

ABSTRACT

Infertility is a significant health issue affecting a large portion of the global population, with sperm morphology evaluation being crucial in diagnosing and treating this condition. Although traditional methods based on WHO parameters are widely used, they may not be sufficient for an accurate diagnosis. In response, the sixth edition of the WHO laboratory manual (2021) recommended the implementation of indices such as the Teratozoospermia Index (TZI), Multiple Anomalies Index (MAI), and Sperm Deformity Index (SDI). These indices allow for a more detailed assessment of sperm defects, providing a more precise guide for selecting treatments and assisted reproductive techniques.

This retrospective, descriptive, correlational, and comparative study was conducted at a reproductive medicine clinic in Guayaquil, Ecuador, from January to May 2024. It analyzes the relationship between these indices and other fundamental seminal parameters to determine their relevance and applicability in reproductive medicine. A sample of thirty patients was selected using non-probabilistic convenience sampling.

The findings underscore the pivotal role of sperm morphology in assessing semen quality and its influence on male fertility. The correlations between different morphological indices and seminal parameters indicate that morphological abnormalities, particularly in the sperm neck, can significantly affect motility and fertilizing capacity. The MAI index, with its strong correlations with head and neck abnormalities, emerges as a comprehensive method for an integral evaluation. Conversely, the TZI is effective in detecting neck abnormalities, but its utility is limited in other areas. The study also highlights the need for further research due to the ongoing debate in the literature about the correlation between sperm morphology and other seminal parameters. It's important to note the study's limitations, such as the short analysis period, to ensure that reproductive medicine professionals and clinicians in the audience are aware of the potential challenges in the field.

Key Words: Infertility, Sperm morphology, TZI, MAI, SDI, Semen evaluation, Assisted reproduction.

Índice de Contenido

Capítulo I.....	1
1. Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Hipótesis	2
1.4. Objetivos	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos.....	3
Capítulo II.....	4
2. Fundamentos Teóricos	4
2.1. Fertilidad e Infertilidad Humana	4
2.2. Aparato Reproductor Masculino.....	5
2.3. Espermatogénesis	6
2.3.1. Interfase.....	6
2.3.2. Meiosis I.....	7
2.3.3. Meiosis II	7
2.3.4. Diferenciación	7
2.4. Regulación hormonal en la espermatogénesis.....	7
2.4.1. Testosterona.....	7
2.4.2. Hormona foliculoestimulante (FSH).....	7
2.4.3. Hormona luteinizante (LH).....	8
2.4.4. Inhibina	8
2.4.5. Prolactina.....	8
2.5. Anatomía y fisiología del espermatozoide	8
2.5.1. Cabeza.....	8
2.5.2. Cuello	9
2.5.3. Cola	9
2.6. Infertilidad Masculina	10
2.6.1. Edad	10
2.6.2. Varicocele.....	10
2.6.3. Infertilidad Idiopática	11
2.6.4. Hipogonadismo.....	11
2.6.5. Criptorquidia.....	11
2.6.6. Azoospermia obstructiva	12

2.6.7. Factores ambientales.....	12
2.6.8. Nutrición y peso	12
2.6.9. Factores genéticos	13
2.7. Estudio de la infertilidad masculina.....	13
2.8. Parámetros Seminales.....	13
2.9. Análisis macroscópico	14
2.9.1. Volumen seminal.....	14
2.9.2. Licuefacción	15
2.9.3. Viscosidad	15
2.9.4. pH.....	15
2.10. Análisis microscópico.....	16
2.10.1. Concentración de espermatozoides	16
2.10.2. Motilidad espermática.....	16
2.10.3. Progresión espermática	16
2.10.4. Morfología espermática	17
2.11. Evaluación avanzada	19
2.11.1. Madurez espermática.....	19
2.11.2. ADN espermático	20
2.11.3. Fragmentación del ADN.....	20
2.12. Técnicas de la Reproducción Asistida (TRA)	22
Capítulo III.....	23
3. Materiales y métodos	23
3.1. Diseño del Estudio	23
3.2. Población y Muestra.....	23
3.3. Variables	23
3.4. Recolección de datos	24
3.5. Criterios de exclusión	25
3.6. Metodología	25
3.6.1. Análisis macroscópico.....	25
3.6.1.1. Volumen	25
3.6.1.2. Licuefacción	25
3.6.1.3. Viscosidad	26
3.6.1.4. pH.....	26
3.6.1.5. Color.....	26
3.6.2. Análisis microscópico.....	26
3.6.2.1. Concentración de espermatozoides	26
3.6.2.2. Número total de espermatozoides	26

3.6.2.3. Motilidad espermática.....	27
3.6.2.4. Progresión espermática	27
3.6.2.5. Morfología estricta Tygerberg	28
3.6.2.5.1. Frotis del eyaculado	28
3.6.2.5.2. Tinción.....	28
3.6.2.5.3. Observación según criterios Kruger-OMS 2021	29
3.7. Pruebas avanzadas	29
3.7.1. Madurez Espermática: Prueba HBA	29
3.7.2. Fragmentación de ADN: Técnica Dispersión de la Cromatina (SCD)	30
3.7.2.1. Preparación de Reactivos.....	30
3.7.2.2. Preparación de la Muestra de Semen	31
3.7.2.3. Procesamiento de Muestra.....	32
3.7.2.4. Proceso de Fijación y Tinción de Espermatozoides.....	33
3.7.2.5. Observación de Espermatozoides.....	33
3.8. Evaluación de Índices de morfología espermática	35
3.8.1 Índice de teratozoospermia (TZI).....	35
3.8.2. Índice anomalías múltiples (MAI)	36
3.8.3. Índice de deformidades espermáticas (SDI).....	37
Capítulo IV	38
4. Resultados y Discusión	38
4.1. Resultados	38
4.2. Discusión.....	52
Capítulo V.....	56
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	56
5.1. Conclusiones	56
5.2. Recomendaciones.....	57
Bibliografía	58

Índice de Figuras

Figura 1. Aparato Reproductor Masculino	5
Figura 2. Espermatogénesis.....	6
Figura 3. Morfología espermatozoide.	9
Figura 4. Morfología Anormal	18
Figura 5. Clasificación espermática según MAI	19
Figura 6. Técnica de frotis recomendada por la OMS	28
Figura 7. Técnica de ensayo HBA	30
Figura 8. Diámetro de halo en fragmentación de ADN.....	33
Figura 9. Correlación parámetros seminales y pruebas avanzadas	42
Figura 10. Correlación entre edad, HBA, índice de fragmentación de ADN (IFA) y morfología normal según OMS.....	43
Figura 11. Correlación de parámetros seminales y el índice de TZI.....	44
Figura 12. Correlación de parámetros seminales y el índice de MAI	45
Figura 13. Correlación de parámetros seminales y el índice de SDI	46
Figura 14. Correlación de parámetros seminales y los índices de evaluación morfológica de espermatozoides.	48
Figura 15. Gráfico de correlación de índice TZI y anomalías reportadas.....	49
Figura 16. Gráfico de correlación de índice MAI y anomalías reportadas.	50
Figura 17. Gráfico de correlación de índice SDI y anomalías reportadas.....	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Límites de decisión para parámetros seminales establecidos por la OMS 2021	14
Tabla 2. Clasificación de halos en la fragmentación de ADN.....	34
Tabla 3. Diferencias significativas entre variables del registro clínico	39
Tabla 4. Diferencias significativas entre variables del análisis seminal.....	39
Tabla 5. Diferencias significativas entre variables del índice de teratozoospermia	40
Tabla 6. Diferencias significativas entre variables del índice de anomalías múltiples.....	40
Tabla 7. Diferencias significativas entre variables del índice de deformidades espermáticas.	41

Capítulo I

1. Antecedentes

1.1. Introducción

La infertilidad es un problema de salud que afecta a una gran parte de la población mundial, pero que a menudo no se reporta ni se trata adecuadamente. Dentro del ámbito de la medicina reproductiva, el análisis de la calidad del semen es un pilar fundamental para el diagnóstico y tratamiento de esta condición. La evaluación morfológica de los espermatozoides, en particular, ha sido ampliamente reconocida como un factor crucial en la identificación de anomalías que podrían interferir en la capacidad de fecundación (Kruger, 1988). Sin embargo, los métodos tradicionales basados en los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) pueden no ser suficientes para un diagnóstico preciso y efectivo.

En respuesta a esta limitación, en la sexta edición del manual de laboratorio de la OMS para examen y procesamiento de semen humano (2021) se ha recomendado la implementación de índices que cuantifiquen las anomalías específicas presentes en la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide como el índice de teratozoospermia (TZI), índice de anomalías múltiples (MAI), y el índice de deformidades espermáticas (SDI), permitiendo una evaluación más detallada y específica de los defectos espermáticos. Estos índices no solo facilitan una clasificación más exhaustiva de las malformaciones espermáticas, sino que también pueden ofrecer una guía más precisa para la selección de tratamientos y técnicas de reproducción asistida, optimizando las posibilidades de éxito en la fertilización.

Este estudio tiene como objetivo principal analizar la relación entre estos índices y otros parámetros seminales fundamentales a través de un enfoque documental y bioestadístico. Se buscará determinar la relevancia y aplicabilidad de estos índices en el contexto de la medicina reproductiva, particularmente en una clínica de Guayaquil, Ecuador. La investigación no solo pretende aportar al conocimiento científico sobre la evaluación morfológica espermática, sino también ofrecer herramientas prácticas para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad, beneficiando así tanto a pacientes como a profesionales de la salud reproductiva.

1.2. Justificación

La evaluación morfológica de espermatozoides es una variable determinante en el diagnóstico de muestras en las que se sospecha infertilidad, asimismo, ayuda en la selección de tratamiento y técnica de reproducción asistida a realizar para lograr la fertilización del óvulo. Sin embargo, esta evaluación no se limita solo a los parámetros establecidos por la OMS. En la actualidad, se han desarrollado tres índices de múltiples defectos espermáticos que estudian y clasifican estas malformaciones en el espermatozoide mediante distintos enfoques, como el MAI, TZI y SDI.

Este estudio aborda la problemática de comprender la relación de estos índices con otros parámetros importantes que se analizan en el momento de realizar un espermograma al paciente como la concentración espermática, la motilidad, la prueba de madurez espermática y el nivel de fragmentación de ADN.

La biotecnología reproductiva puede verse beneficiada de la evaluación de estos índices para la selección de espermatozoides en pacientes que reflejan parámetros anormales en sus muestras seminales. A partir de la evaluación morfológica, cuya técnica es sencilla y básica en un espermograma, se puede determinar la relevancia de estos índices y analizar, desde un enfoque estadístico, su correlación con los parámetros mencionados anteriormente que ayudan en el diagnóstico de una muestra logrando así, asignar la mejor técnica de reproducción asistida con el fin de alcanzar la concepción.

1.3. Hipótesis

Ho: Uno (o más) de los tres métodos de evaluación morfológica espermática (TZI, MAI, SDI) demuestra ser más competente y correlacionarse mejor con los parámetros básicos de la OMS 2021, aplicados en la selección de espermatozoides para técnicas de reproducción asistida, en comparación con los otros métodos.

H1: Uno (o más) de los tres métodos de evaluación morfológica espermática (TZI, MAI, SDI) no demuestra ser más competente y correlacionarse mejor con los parámetros básicos de la OMS 2021, aplicados en la selección de espermatozoides para técnicas de reproducción asistida, en comparación con los otros métodos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Analizar los métodos de evaluación morfológica de espermatozoides humanos a través de un enfoque documental y bioestadístico en una clínica de medicina reproductiva en Guayaquil, Ecuador.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Compilar información documental de muestras seminales humanas en una clínica reproductiva de Guayaquil, Ecuador.
2. Evaluar si existe correlación entre los índices de múltiples defectos espermáticos y los parámetros básicos de la OMS 2021 para evaluación de espermatozoides.
3. Comparar los tres métodos propuestos de evaluación morfológica espermática (MAI; TZI; SDI) para la selección de espermatozoides en el uso de técnicas de reproducción asistida.

Capítulo II

2. Fundamentos Teóricos

2.1. Fertilidad e Infertilidad Humana

El término fertilidad se refiere a la capacidad de establecer un embarazo clínico (Zeggars, 2022). La Organización Mundial de la Salud (2021) define la infertilidad como la imposibilidad de concebir de forma natural, sin métodos anticonceptivos, luego de un periodo de 12 meses siendo la pareja menor de 35 años. La infertilidad es una condición médica que involucra tanto al paciente como a su pareja, por lo que puede ocasionar agravios psicológicos, físicos, mentales y espirituales (Walker *et al*, 2022). La OMS llevó a cabo un estudio a escala internacional para determinar las etiologías de la infertilidad. Una de cada seis parejas en edad reproductiva sufre de infertilidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en la sexta edición de su manual de laboratorio para el examen y procesamiento de semen humano (2021), establece una clasificación de las muestras seminales basada en parámetros que han sufrido modificaciones en los últimos años. Esta revisión se debe, en parte, a la disminución generalizada de la calidad seminal, un fenómeno atribuido a cambios epigenéticos y factores ambientales adversos, como la exposición a metales pesados, pesticidas, tabaco, dioxinas, y bisfenoles presentes en plásticos reportado en un análisis que abarca datos de fertilidad masculina recopilados entre 2015 y diciembre de 2023 (Wdowiak *et al*, 2024).

Este deterioro en la calidad del semen ha sido observado a nivel mundial y refleja una tendencia preocupante que también se manifiesta en América Latina. En un estudio realizado en Uruguay, Rosa-Villagrán *et al.* (2021) encontraron que la morfología espermática de los hombres nacidos después del año 2000 mostró un declive significativo en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, en comparación con aquellos nacidos antes de esa fecha. Estos hallazgos sugieren un impacto creciente de factores ambientales y epigenéticos en la infertilidad masculina, con implicaciones graves para la salud reproductiva tanto a nivel global como en la región latinoamericana.

En Guayaquil, la infertilidad es un problema de salud registrado con escasez pero que representa complicaciones en el momento en que una pareja desea concebir. En 2020, se identificó que el 72,6% de varones, de un grupo de pacientes con problemas de fertilidad en la ciudad de Guayaquil, tenían parámetros de calidad del semen por debajo de los límites de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Dentro de este porcentaje, el 27,9% fue diagnosticado con teratozoospermia (Morey-León *et al.*, 2020); definida como la anormalidad morfológica de espermatozoides (Kruger *et al.*, 1988).

2.2. Aparato Reproductor Masculino

El aparato reproductor masculino consiste en estructuras internas (testículos, epidídimo, los conductos deferentes y la próstata) y estructuras externas (escroto y pene). Estas estructuras se caracterizan por ser vascularizadas y contener varias glándulas y conductos para promover la formación, el almacenamiento y la eyaculación de los espermatozoides (Mawhinney y Mariotti, 2013). (Figura 1).

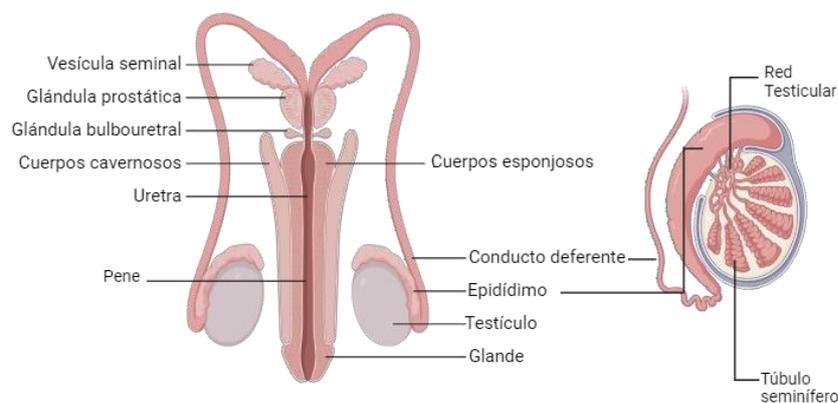


Figura 1. Aparato Reproductor Masculino. El aparato reproductor masculino estos compuestos por órganos internos y externos.

Los espermatozoides son producidos en los testículos, protegidos por una bolsa de piel denominada escroto. Estos son colectados en el epidídimo donde sucede su maduración y almacenamiento hasta ser transportados detrás de la vejiga, mediante los conductos deferentes. En este trayecto, la vesícula seminal se encarga de agregar fluido para formar el líquido seminal rico en fructosa capaz de nutrir y aportar energía a los espermatozoides. De la misma manera,

la próstata adiciona secreciones prostáticas altas en zinc y enzimas que mejoran la movilidad y vitalidad espermática. Antes de ser eyaculado, las glándulas bulbouretrales secretan líquido lubricante que protege el pH del espermatozoide ante posible acidez en la uretra, donde finalmente es eyaculado a través del pene (Hirsch, 2023).

2.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un ciclo largo en el que las células germinales son proliferadas y diferenciadas desde su estado inicial de espermatogonia hasta un espermatozoide de madurez completa (Sakkas, 1999), que toma alrededor de 64 días en humanos de completar, dependiente de una correcta regulación hormonal y un complejo sistema de transcripción de genes y traducción de proteínas que cumplan con su papel en cada etapa de diferenciación celular (O'Donnel et al, 2017; Du et al, 2021). (Figura 2).

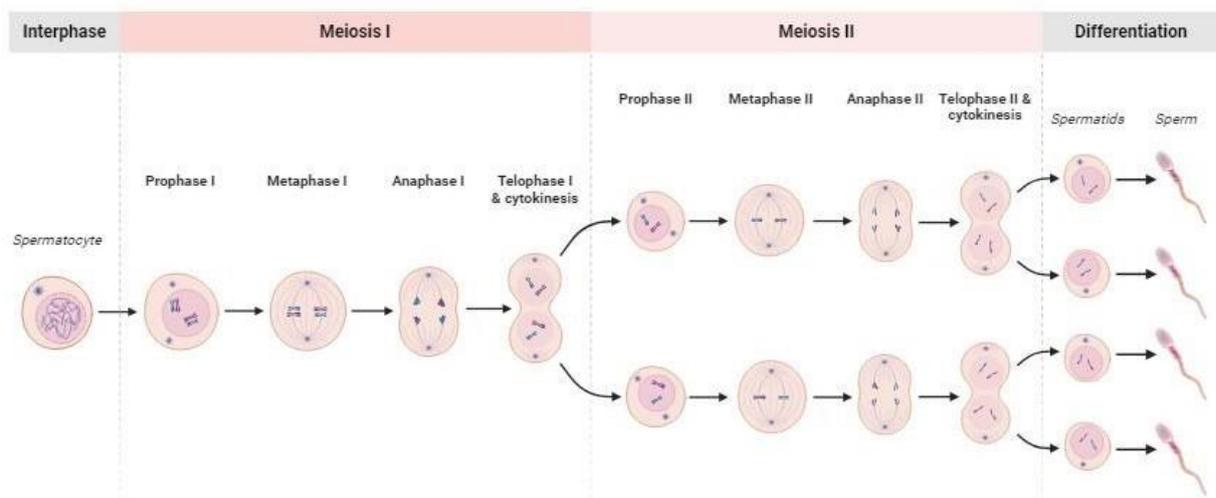


Figura 2. Espermatogénesis. Proceso en el cual los espermatozoides se producen a partir de las células germinales primordiales del hombre a través de la meiosis.

2.3.1. Interfase

Las espermatogonias pasan por la fase G1 para aumentar de tamaño, sintetizar proteínas y orgánulos para la división celular. Luego, en la fase S sucede la replicación del ADN donde cada cromosoma se duplica formando dos cromátidas para que, posterior, la célula entre a fase G2 preparándose para la meiosis y reparando cualquier daño en el ADN. La espermatogonia se divide mitóticamente originando espermatocitos primarios (Suede *et al*, 2023).

2.3.2. Meiosis I

En esta fase de maduración, el espermatocito primario se divide en espermatocitos secundarios, pasando de un número cromosómico diploide a haploide (Quintero-Vásquez, *et al.* 2015; Smith y Walker, 2014). Al final de este proceso la célula se divide en dos células hijas, en esta etapa ocurre intercambios de fragmentos de ADN entre cromosomas homólogos que pueden llegar a aumentar la diversidad genética.

2.3.3. Meiosis II

En la segunda división meiótica, los espermatocitos secundarios se dividen una vez más para llevar a cabo la formación de células haploides inmaduras, denominadas espermátidas. Resulta en cuatro células hijas haploides (Smith y Walker, 2014; Suede *et al.*, 2023).

2.3.4. Diferenciación

Finalmente, las células espermátidas prosiguen su maduración hasta alcanzar el estado de espermatozoide. En esta etapa suceden características importantes como el intercambio de histonas a protaminas que se encargan de empaquetar el material genético paterno en el núcleo del espermatozoide (Quintero-Vásquez, *et al.* 2015).

2.4. Regulación hormonal en la espermatogénesis

2.4.1. Testosterona

La espermatogénesis depende de la habilidad de producción de testosterona secretada por las células Leydig o intersticiales (O'Donnell *et al.*, 2017). Su función principal es la diferenciación de espermatogonias.

2.4.2. Hormona foliculoestimulante (FSH)

La hipófisis secreta la hormona foliculoestimulante (FSH) que actúa sobre el testículo regulando la formación de nuevos espermatozoides y la acumulación de proteínas fijadoras andrógenos (Ramaswamy y Weinbauer, 2015). La FSH desempeña un papel crucial en la espermatogénesis al actuar sobre las células de Sertoli, que son las encargadas de nutrir y sostener a los espermatozoides en desarrollo (O'Donnell *et al.*, 2017).

2.4.3. Hormona luteinizante (LH)

A su vez, la hipófisis también segrega LH para mantener una continua estimulación de la producción de testosterona por las células Leydig (Ramaswamy y Weinbauer, 2015; Machlan, 2000).

2.4.4. Inhibina

Las células de Sertoli producen la inhibina como mecanismo de retroalimentación negativa para inhibir el exceso de FSH, controlando la cantidad de espermatozoides producidos (Ramaswamy y Weinbauer, 2015).

2.4.5. Prolactina

La prolactina está correlacionada con la producción de testosterona e incluso puede llegar a afectar la motilidad de los espermatozoides (Ramaswamy y Weinbauer, 2015).

2.5. Anatomía y fisiología del espermatozoide

2.5.1. Cabeza

- Acrosoma: Vesícula secretora que lleva a cabo la reacción acrosómica, que involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal en la matriz extracelular del ovocito con el fin de capacitar al espermatozoide para liberar enzimas que favorezcan su entrada a la zona pelúcida (Del Río *et al*, 2007).
- Núcleo: Se considera la parte más importante de la cabeza puesto que en ella se encuentra el material genético, 23 cromosomas condensados cuyo objetivo será fusionarse con el núcleo del óvulo para formar un cigoto (Alberts *et al*, 2002).

2.5.2. Cuello

- **Centriolo:** Entre la unión presente en la cabeza y pieza media, se encuentra el centriolo. Los espermatozoides tienen dos centriolos, uno canónico y otro atípico, que desempeñan roles fundamentales durante la espermatogénesis, en la formación del flagelo y la división celular. En el espermatozoide maduro, los centriolos conectan la cabeza con la cola y regulan el movimiento del flagelo. Tras la fertilización, los centriolos ayudan a organizar el citoesqueleto del cigoto. A diferencia de otras células, los centriolos en los espermatozoides tienen características y funciones únicas adaptadas a la reproducción (Avidor-Reiss *et al*, 2020). Según NIH (2024), el centriolo es una parte fundamental para la formación del huso mitótico durante las primeras fases de división celular en la espermatogénesis, cuya función es dar paso a la citocinesis.
- **Mitocondrias:** Se encargan de generar la energía necesaria en forma de ATP para permitir la movilidad del espermatozoide, impulsando su nado hacia el óvulo (Beltrán, 2019).

2.5.3. Cola

- **Flagelo:** Le brinda la capacidad de movimiento en su tránsito por el epidídimo después de la eyaculación. Está compuesto por un axonema, que es un complejo de 9 pares de microtúbulos (patrón de 9+2). Este patrón es esencial para generar el movimiento ondulante que propulsa al espermatozoide a través del tracto reproductivo femenino (Olivera *et al*, 2006).

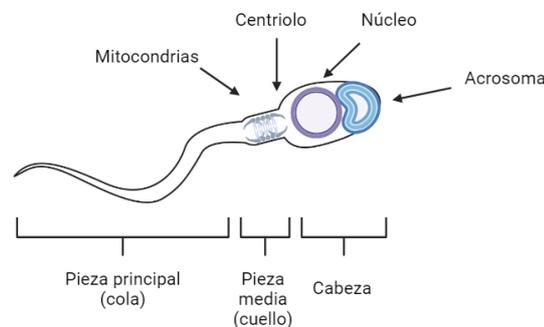


Figura 3. Morfología espermatozoide. El espermatozoide es el gameto masculino, una célula reproductora haploide aportada por el hombre para formar un embrión. Esta se divide en tres subpartes: cabeza, cuello y cola. (Olivera *et al*, 2006)

2.6. Infertilidad Masculina

La incapacidad de lograr un embarazo después de un año de relaciones sexuales sin protección puede radicar en un problema desde el factor masculino (Leslie et al, 2024). Por ende, es fundamental evaluar la capacidad seminal del hombre para determinar si es apto para realizar técnicas de reproducción asistida, identificar anomalías genéticas u hormonales que puedan estar afectando la regulación espermática. Se discute la prevalencia de la infertilidad masculina debido a que no es reportada como una enfermedad. Además, los tratamientos de infertilidad generalmente son privatizados por lo que no se refleja en estadísticas de seguros médicos públicos (Leslie et al, 2024). A nivel mundial, la OMS (2021) considera que un sexto de todas las parejas en el mundo enfrenta problemas de infertilidad y, de ellos, el 20% de los casos de infertilidad se asumen al factor masculino. Se han considerado diversos factores responsables de la infertilidad masculina como:

2.6.1. Edad

La edad es un factor importante para discutir cuando se habla de fertilidad masculina. Con los años, un hombre sufre una disminución de testosterona que puede conllevar a otras afecciones como el hipogonadismo que podrían llegar a agravarse hasta la detención de la espermatogénesis (Sharma *et al*, 2013). Dunson *et al* (2004) identificaron que, a partir de los 35 años, los parámetros seminales se ven notablemente disminuidos tanto en volumen y motilidad, mientras que, la morfología anormal se ve aumentada significativamente.

2.6.2. Varicocele

Esta enfermedad se trata del agrandamiento venoso en el plexo pampiniforme testicular (Zeggars, *et al*. 2017). El varicocele puede afectar la fertilidad masculina dado al aumento de temperatura testicular dentro del escroto, la generación de altos niveles reactivos de oxígeno y la disminución de producción de testosterona que alteran la espermatogénesis. En 2020, se reportó una prevalencia del 37,3% en la infertilidad masculina a nivel mundial (Fallara *et al*, 2020).

2.6.3. Infertilidad Idiopática

La infertilidad idiopática se presenta en los casos donde no se logra identificar una causa específica que atribuya a la infertilidad. Cuando los análisis seminales se encuentran dentro de los límites de decisión reportados por la OMS (2021) como normozoospermia, se determina como infertilidad masculina idiopática o, pareja infértil. Su prevalencia es de 30,3% a nivel global (Fallara *et al*, 2020).

2.6.4. Hipogonadismo

Este trastorno se caracteriza por una disfunción testicular que podría causar afectaciones en la formación de espermatozoides y hasta en la producción de testosterona. El hipogonadismo surge con una sintomatología que involucra la carencia de andrógenos (Dohle *et al*, 2010).

2.6.5. Criptorquidia

El estudio de Fallara *et al*. (2020), lo identifica como el 7,5% de la causa de infertilidad masculina. La criptorquidia es un antecedente que llega a reducir la fertilidad masculina, aun cuando esta afección haya sido corregida de forma quirúrgica. La condición en la que uno o ambos testículos no descienden al escroto se ha relacionado con una mala calidad seminal que incluye motilidad baja y morfología anormal.

Asimismo, el malfuncionamiento de las células Sertoli, esenciales para la producción de inhibina y regular negativamente la espermatogénesis, y las muestras seminales de baja concentración espermática se evidencian como resultado de la criptorquidia. Sin embargo, esto no necesariamente indica irregularidades en el funcionamiento de las células de Leydig y, consecuentemente, en los niveles de testosterona (Aldahhan *et al*, 2021).

La espermatogénesis se ve detenida en los hombres que sufren de criptorquidia debido a desbalances hormonales y anomalías genéticas asociadas con esta aflicción. Debido a que el riesgo de infertilidad es mayor mientras más tardía sea la cirugía de descenso de testículos denominada orquidopexia, es importante realizarla en el primer año de vida del niño con el fin de revertir de forma temprana afecciones en la cantidad y funcionalidad de las células germinales (Blanco *et al*, 2015).

2.6.6. Azoospermia obstructiva

La ausencia de espermatozoides en el eyaculado debido a la oclusión del sistema ductal (Zeggars, 2017). Los hombres con azoospermia obstructiva suelen tener testículos de tamaño y niveles normales de FSH. Durante la evaluación, se puede observar un aumento en el tamaño del epidídimo. En algunos casos, los conductos deferentes pueden estar ausentes, ya sea por causas congénitas o por intervenciones quirúrgicas previas en la zona inguinal o escrotal (Dohle, *et al.* 2010).

Las obstrucciones en los casos de infertilidad primaria en hombres generalmente se localizan en el epidídimo, aunque también pueden afectar los conductos eyaculadores y los conductos deferentes. En aproximadamente el 25% de los hombres con sospecha de obstrucción, no se encuentran espermatozoides en el epidídimo durante el examen escrotal, lo que sugiere que la obstrucción podría estar ubicada dentro de los testículos (Dohle, *et al.* 2010).

2.6.7. Factores ambientales

Existen informes que vinculan la contaminación del aire con la fertilidad masculina. Estudios han mostrado que los hombres expuestos a mayores niveles de contaminación del aire tienden a presentar una mayor frecuencia de anomalías en la morfología del espermatozoide, disminución en la motilidad y mayor fragmentación del ADN. Además, se observó una relación inversa significativa entre la concentración de espermatozoides y la exposición al ozono. (Sokol *et al.*, 2006; Rubes *et al.*, 2005).

2.6.8. Nutrición y peso

El estilo de vida, incluyendo la dieta y el peso corporal, influye significativamente en la fertilidad masculina. Una dieta rica en carbohidratos, fibra, folato y licopeno, junto con una menor ingesta de proteínas y grasas, se asocia con una mejor calidad del semen (Sharma *et al.*, 2013).

Asimismo, la obesidad tiene un impacto negativo notable en la fertilidad masculina; un aumento en el índice de masa corporal (IMC) está correlacionado con una disminución en la calidad del semen y un aumento en el daño del ADN en los espermatozoides. La obesidad también puede causar disfunción eréctil y afectar negativamente los niveles de hormonas como

inhibina B y leptina, que son importantes para la producción de espermatozoides (Sharma *et al*, 2013).

2.6.9. Factores genéticos

Reijo, *et al* (1996) reporta que entre 10 a 13% de pacientes que padecen de azoospermia, la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, son portadores de una microdelección en el cromosoma Y. Este tipo de anomalía cariotípica y microdelecciones son frecuentes en pacientes que muestren un ciclo de espermatogénesis alterado (Jarow *et al*, 2010).

2.7. Estudio de la infertilidad masculina

La evaluación clínica de la fertilidad masculina incluye una serie de métodos y procedimientos diseñados para diagnosticar problemas que pueden afectar la capacidad de un hombre para concebir. Según el manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el examen y procesamiento de semen humano 2021, la evaluación comienza con una historia clínica detallada y un examen físico. Esto incluye la revisión de antecedentes médicos, quirúrgicos, y reproductivos, así como la evaluación de factores de estilo de vida que pueden impactar la fertilidad, como el consumo de tabaco, alcohol, y exposición a toxinas ambientales. Además, se realizan análisis hormonales y genéticos para identificar posibles desequilibrios hormonales o anomalías cromosómicas. La evaluación clínica también puede incluir estudios de imagen, como ecografías testiculares, para detectar anomalías estructurales en el sistema reproductivo masculino.

El espermograma es un examen que proporciona información clave sobre la fertilidad masculina analizando la calidad del semen, incluyendo parámetros como la concentración de espermatozoides, su motilidad, morfología y volumen del eyaculado.

2.8. Parámetros Seminales

La sexta edición del manual de la OMS (2021) establece límites de decisión para clasificar la calidad seminal entre los parámetros macroscópicos y microscópicos analizados en una muestra. Entre los principales que se enfatiza se encuentran en la Tabla 1.

En el manual de examen y procesamiento de semen humano de la OMS se especifica que no hay nombres de diagnósticos, por ende, las antiguas etiologías mencionadas en los anteriores manuales también han sido descartadas (OMS, 2021).

Tabla 1. Límites de decisión para parámetros seminales establecidos por la OMS 2021

Parámetro seminal	Límites de decisión	Unidad
Volumen Seminal	1.4	ml
Concentración espermática	16.0	$\times 10^6$ /ml
Concentración total de espermatozoides	39.0	$\times 10^6$
Motilidad	42.0	%
Morfología estricta normal	4.0	%

(La autora, 2024)

2.9. Análisis macroscópico

2.9.1. Volumen seminal

El semen consta de dos componentes, los espermatozoides y el plasma seminal (agua, carbohidratos, iones, lípidos y proteínas). El volumen seminal proporciona información sobre la actividad secretora y el funcionamiento de las glándulas sexuales que responden a la estimulación de nervios autónoma infligida por excitación sexual y una correcta preparación previa a la eyaculación (OMS, 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud, un volumen menor a 1,4 ml indicaría posibles niveles de testosterona baja, vesículas seminales retraídas por efecto de infecciones, conductos eyaculatorios obstruidos, ausencia congénita bilateral de los conductos deferentes (CBAVD), problemas en la colección de la muestra (perdida de alguna fracción) o, eyaculación retrograda parcial (OMS, 2021). Es importante para la determinación del número total de espermatozoides puesto que se calcula multiplicando el volumen junto a la concentración espermática.

2.9.2. Licuefacción

Una vez la muestra seminal sea tomada, ocurre el proceso de licuefacción de manera natural. Al momento de la eyaculación, es común que se perciba como una masa gelificada semisólida con presencia de grumos que, a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos, alcanzará su homogeneización y una consistencia más acuosa, aun conservando un nivel de viscosidad superior al del agua. En caso de que esta no sea completada, el manual de la OMS (2021) recomienda incubar la muestra a 37°C alrededor de 30 a 60 minutos.

Dentro de una muestra considerada normal por la OMS (2021) se puede llegar a apreciar gránulos o cuerpos gelatinosos que no se licuan por completo. Sin embargo, es importante reportar la presencia de hilos de moco, pues estos podrían interferir en la examinación del eyaculado.

2.9.3. Viscosidad

El nivel de viscosidad que se considera normal en una muestra seminal es de aproximadamente 1,5 mm; la OMS (2021) recomienda que esta medición sea estimada usando una pipeta de plástico desechable. Un eyaculado de licuefacción normal, debería caer en gotas pequeñas, por el contrario, si la viscosidad se ve alterada la gota puede verse como un hilo y estirarse hasta más de 2,0 cm.

2.9.4. pH

La medición de pH del eyaculado puede llegar a variar de 7,2 a 8,2. Si el pH es menor de 7.0 en una eyaculación sin espermatozoides, puede haber una ausencia congénita bilateral del conducto deferente. Debido al origen embrionario común, las vesículas seminales también pueden estar ausentes o poco desarrolladas, lo que causa un bajo volumen de semen y un pH bajo (OMS, 2021).

2.10. Análisis microscópico

2.10.1. Concentración de espermatozoides

Es esencial determinar la concentración de espermatozoides por millón presente en el eyaculado, ya sea mediante cámara de Neubauer o Mackler. Este valor otorga una medición a la producción testicular de espermatozoides que se verán depositados en el canal uterino durante el coito en la mujer (OMS, 2021). El número total de espermatozoides es determinado se calcula mediante la concentración y el volumen seminal. La OMS (2021) enfatiza en que este número se ha correlacionado con los resultados de reproducción y tasas de embarazo.

2.10.2. Motilidad espermática

Aitken *et al.* (1985) descubrieron que los patrones de movilidad de los espermatozoides en el semen comparten una correlación fuerte y positiva con su potencial de penetración de la mucosa cervical. Asimismo, se resalta que una morfología adecuada en la cabeza de los espermatozoides podría ser un requisito para introducirse de forma eficaz entre la mucosidad femenina.

2.10.3. Progresión espermática

La velocidad de movimiento en un espermatozoide depende de la temperatura en la que se encuentra el mismo. Debido a este principio, se prefiere mantener un valor de temperatura correspondiente a la del cuerpo humano a 37°C (OMS, 2021). La sexta edición del manual categoriza la progresión espermática en:

- Progresión A (PA): Rápida; movilidad activa lineal o en círculos largos que cubren una distancia de al menos 25 μm en un segundo.
- Progresión B (PB): Lenta; aún existe movilidad activa desde un punto inicial a uno final de 5 a 25 μm en un segundo.
- Progresión C: *In situ*; no hay una progresión sin embargo se evidencia movimientos flagelares o nado en pequeños círculos.

2.10.4. Morfología espermática

a. Morfología estricta por la OMS.

El manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento de semen humano adoptó los criterios de morfología estricta de Tygerberg a partir del año 1999 en la publicación de su cuarta edición; continuando así, su uso hasta el manual actual en 2021. Este método de clasificación para espermatozoides fue propuesto por Menkveld *et al.* (1990) bajo el fundamento de que los espermatozoides que alcanzaban a adherirse al moco cervical evidenciaban una mejor morfología que aquellos disponibles libremente en las muestras seminales. Por lo tanto, el método de Tygerberg relaciona la morfología normal con la madurez espermática (Menkveld *et al.*, 1991). (Figura 4).

b. Índice de Teratozoospermia (TZI)

La teratozoospermia se reporta como una reducción del número de espermatozoides morfológicamente normales, según los límites de decisión establecidos por la OMS (2021). El TZI únicamente desglosa en un máximo de cuatro defectos por espermatozoide anormal, categorizados en cabeza, cuello, cola y residuo citoplasmático. Este último en la clasificación se agregó a partir de la quinta edición del manual de la OMS, son componentes normales de los espermatozoides funcionales, pero en exceso indican una morfología defectuosa y sensible a cambios osmóticos. La suma total de estos defectos es dividida por el número total de espermatozoides anormales, obteniendo el TZI de dos decimales (OMS, 2021). El valor de TZI puede variar entre 1,0 y 4,0 (Menkveld, 2012).

c. Índice de Deformidades Espermáticas (SDI)

El SDI se define como el número de defectos dividido por el total de espermatozoides contados, tanto normales como anormales. Aziz *et al.*, (1996) destaca que este índice establece diez subgrupos para identificar los espermatozoides anormales, se recomienda basarse en los criterios de Tygerberg adoptada desde 1999 para comprender esta clasificación. Además, se recurre al término borderline para definir a los espermatozoides considerados anormales por presentar una cabeza ovalada o redonda y, aquellos con cabeza normal pero que se observe una pieza intermedia gruesa.

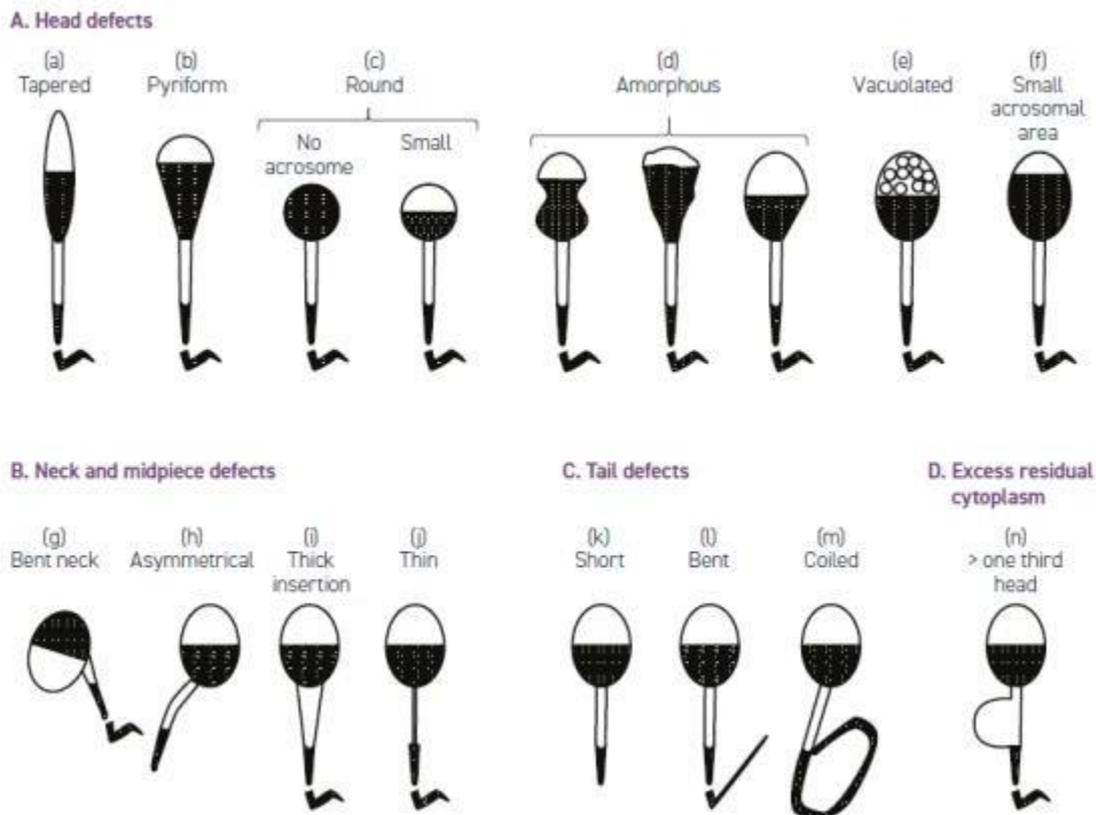


Figura 4. Morfología Anormal. Criterios de clasificación morfológica estricta de espermatozoides (OMS, 2021)

d. Índice de Anomalías Múltiples (MAI)

MAI es el cálculo del número promedio de anomalías por el número de espermatozoides anormales (OMS, 2021). Esta clasificación involucra siete tipos de anomalías en la sección de cabeza, tres defectos en la pieza media y hasta cinco en la cola del espermatozoide (Auger *et al.*, 2001) (Figura 5). Todas estas anomalías registradas en una muestra se deben incluir en el cálculo.

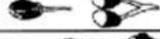
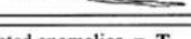
Morphologically normal 		34
Head Anomalies	Tapered 	0
	Thin 	◆ 3
	Microcephalous 	3
	Macrocephalous 	2
	Multiple 	0
	Abnormal post-acrosomal region 	◆ 26
	Abnormal or absent acrosome 	◆ 53
Midpiece Anomalies	Cytoplasmic droplet 	2
	Thin 	0
	Bent 	◆ 3
Tail Anomalies	Absent 	2
	Short 	0
	Irregular 	0
	Coiled 	9
	Multiple 	0
	Total number of isolated and associated anomalies = T	
◆ Multiple Anomalies Index (MAI) = T / number of abnormal sperm (66 for 100 spermatozoa assessed)		1.56

Figura 5. Clasificación espermática según MAI (Auger et al., 2001).

2.11. Evaluación avanzada

2.11.1. Madurez espermática

La madurez espermática es medida por el ensayo de unión al hialurónico (HBA, sperm-Hyaluronic Acid Binding test, por sus siglas en inglés), en el que se ha demostrado que los espermatozoides que cumplen son capaces de unirse de manera efectiva al medio cubierto de ácido hialurónico son maduros; han completado su espermatogénesis y la sustitución de histonas por protaminas (Huszar, 2003). El HBA guarda relación con la integridad de la morfología, la motilidad y la maduración del núcleo espermático (Ghaleno *et al.*, 2016). El ensayo de HBA se lo debe realizar dentro de las tres horas de la colección de la muestra en una temperatura de entre 20-30°C. Según el protocolo estandarizado del kit CELL-VU® Sperm-Hyaluronan Binding Assay, se puede interpretar que la maduración espermática y fisiología normal se evidencia en una muestra seminal que reporte más de 70% de espermatozoides motiles ligados.

2.11.2. ADN espermático

Los espermatozoides maduros contienen en su núcleo una estructura altamente compactada y estable, denominada cromatina (Sakkas, 1999). El espermatozoide, a diferencia del ADN presente en las células somáticas, preserva la integridad de su material genético al enrollarse densamente a través de la sustitución de histonas por protaminas que se unen mediante enlaces disulfuro durante la espermatogénesis (González et al 2012). De esta forma, se asegura la transferencia y entrega de información genética del espermatozoide hasta que alcance el óvulo.

La integridad del ADN es crucial para lograr la fertilización y éxito en las técnicas de reproducción asistida. Agarwal (2005) menciona que el 15% de pacientes infértiles reportan un análisis de semen dentro de los parámetros de normalidad, denotando que la concentración, motilidad y morfología no necesariamente reflejaban integridad del ADN espermático intacto.

2.11.3. Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN espermático se define como la aparición del material genético anormal dentro del espermatozoide, por un conjunto de alteraciones que ocasionan rotura en la doble hélice, ya sea de una o doble cadena, modificaciones de bases nitrogenadas, formación de aductos, fenómenos de cross-linking entre ADN o proteínas que provocarían posibles daños en la fecundación, desarrollo embrionario e implantación del futuro embrión (Agarwal et al., 2020).

Existen mecanismos testiculares que pueden inducir la fragmentación del ADN. Durante la espermatogénesis, el intercambio de histonas por protaminas que ocurre en la compactación de la cromatina implica la creación de rupturas en el ADN por acción de la topoisomerasa II con el fin de reducir el estrés torsional (Sakkas et al. 1995; Marcon y Boissonneault 2004). Si estas estructuras no se reparan, se generará una maduración defectuosa resultando en espermatozoides con fragmentación del ADN.

Además, la apoptosis abortiva es un proceso que llega a suceder en el testículo como respuesta a la necesidad de eliminar células germinales defectuosas para que no se diferencien en espermatozoides. Las células de Sertoli son responsables de identificar con marcadores apoptóticos dichas células para que, posteriormente, sean fagocitadas regulando la calidad

seminal (Sakkas, 2010). Ocasionalmente, este mecanismo falla permitiendo la diferenciación de células defectuosas, por consiguiente, la presencia de hebras de ADN fragmentado.

Por otro lado, el estrés oxidativo es un mecanismo post-testicular que induce daño al ADN como producto de las especies reactivas de oxígeno (ROS), puede ocurrir en el epidídimo o en el tracto reproductivo masculino donde los espermatozoides se almacenan y transportan, respectivamente, activando vías apoptóticas una vez fuera del testículo (Agarwal et al., 2020). La producción de ROS es un factor de preocupación en la calidad del espermatozoide. Según Keating, J. et al (1997) existe una correlación positiva entre la morfología anormal de espermatozoides que presentan residuos citoplasmáticos en la pieza media y altas concentraciones de ROS en el plasma seminal. Asimismo, los ROS juegan un papel importante en el aumento de la peroxidación lipídica (Aitken et al, 1992), la cual resulta en la disminución de la motilidad espermática en respuesta a alteraciones en el mecanismo de intercambio de iones (Rao et al, 1989).

Es importante recalcar que existen causas subyacentes por las que se puede producir la fragmentación del ADN debido a riesgos clínicos y ambientales. Entre los factores clínicos, la edad avanzada se asocia con un aumento en la fragmentación del ADN espermático debido al estrés oxidativo y defectos en el empaquetamiento de la cromatina. El varicocele eleva la temperatura testicular y el flujo de metabolitos nocivos, contribuyendo al daño del ADN. Las infecciones genitourinarias, el cáncer testicular y otras afecciones incrementan el estrés oxidativo, mientras que la obesidad y la diabetes están relacionadas con mayores niveles de estrés oxidativo y fragmentación de la cadena. En cuanto a los factores ambientales, la exposición a toxinas como metales pesados y pesticidas, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la exposición a ondas electromagnéticas y la radiación son factores que pueden inducir daño al ADN espermático mediante mecanismos como el estrés oxidativo y la formación de aductos en el ADN.

Las técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN se dividen entre aquellas que miden la susceptibilidad diferencial del ADN para ser desnaturalizado; siendo estas el ensayo de la estructura cromática del espermatozoide (SCSA), la dispersión de la cromatina del espermatozoide (SCD) y el ensayo cometa, mientras que, técnicas como el ensayo de TUNEL tiene la capacidad de marcar la rotura de la cadena del ADN.

La técnica utilizada con mayor frecuencia en los centros de fertilidad es la prueba de la dispersión de la cromatina espermática por su simplicidad y bajo costo. Esta técnica se basa en la desnaturalización del ADN de doble hebra que, al no estar fragmentado, podrá descondensarse permitiendo visualizar la dispersión de halos (OMS, 2021).

2.12. Técnicas de la Reproducción Asistida (TRA)

Según Zegers et al. (2017), las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) comprenden todas las intervenciones que implican la manipulación in vitro tanto de ovocitos humanos como de espermatozoides o embriones con el fin de lograr la reproducción. Esto abarca procedimientos como la fecundación in vitro (FIV) con transferencia embrionaria (TE), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la biopsia embrionaria, el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), la eclosión asistida, la criopreservación de gametos y embriones, la donación de semen, ovocitos y embriones, así como los ciclos con gestantes subrogadas.

Flores (2022) reconoce que las TRA se han visto en constante evolución desde el segundo tercio del siglo XX. La biomedicina ha permitido profundizar los conocimientos acerca de la infertilidad y, con ello, implementar estrategias que enfrenten la incapacidad de reproducirse mediante el uso de la ingeniería biomédica.

Capítulo III

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño del Estudio

El estudio es de tipo retrospectivo, descriptivo, correlacional y comparativo, con un enfoque cuantitativo. Se llevó a cabo en una clínica de medicina reproductiva en Guayaquil, Ecuador durante el periodo de enero a mayo del 2024. Debido a que la investigación se limita a la recolección y análisis de datos ya existentes en los registros clínicos, el investigador no manipuló directamente ninguna de las muestras ni los datos tratados.

Los análisis de las muestras seminales se realizaron siguiendo estrictamente los protocolos establecidos por la sexta edición del manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento de semen humano, publicado en 2021. Asimismo, todo el personal de laboratorio fue capacitado y supervisado para garantizar la fiabilidad y replicabilidad de los análisis, asegurando que todos los exámenes se realicen y reporten bajo los mismos estándares de calidad, sin importar quién los haya efectuado. El estudio se ejecutó bajo el consentimiento informado de todos los participantes, garantizando la confidencialidad de los datos.

3.2. Población y Muestra

La población de estudio consistirá en pacientes que asistan a la clínica de medicina reproductiva durante el periodo de estudio. La muestra estará conformada por 30 pacientes, seleccionados mediante muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.3. Variables

Las variables dependientes son los tres métodos de evaluación morfológica de espermatozoides:

- a. Índice de teratozoospermia (TZI)
- b. Índice de anomalías múltiples (MAI)
- c. Índice de deformidades espermáticas (SDI).

Las variables independientes son los parámetros que se registran para medir la calidad seminal analizados según la OMS (2021):

- a. Edad
- b. Índice de masa corporal (IMC)
- c. Volumen Seminal
- d. Concentración espermática
- e. Número total de espermatozoides
- f. Motilidad espermática
- g. Progresión espermática (PA, PB, PC)
- h. Morfología estricta de Tygerberg (OMS)
- i. Madurez Espermática (HBA)
- j. Índice de Fragmentación de ADN (IFA)

Las variables de control se dividen en las especificaciones demográficas, antecedentes de salud de los pacientes, por otro lado, se encuentran las condiciones de recolección en las que se controla la temperatura y tiempo desde recolección hasta análisis.

3.4. Recolección de datos

Los datos recolectados se obtuvieron de 30 pacientes, cuyas muestras analizadas se aseguró hayan sido manipuladas bajo los mismos estándares y condiciones establecidas por el manual de laboratorio de la OMS para examen y procesamiento de semen humano (OMS, 2021) donde se especifica el método de recolección recomendado es por masturbación en un recipiente estéril, manteniendo la muestra a temperatura ambiente de 30 a 60 min, tiempo necesario para su correcta licuefacción y, posterior análisis.

Se extrajeron datos específicos sobre los resultados de las evaluaciones de morfología de espermatozoides realizadas con los tres métodos seleccionados y los parámetros de calidad seminal, identificando y seleccionando los registros pertinentes dentro del periodo de enero a mayo de 2024. Posteriormente, se codificaron los datos para asegurar la consistencia y precisión en la entrada de información. Finalmente, se revisó y validó los datos recolectados para garantizar su integridad y exactitud.

3.5. Criterios de exclusión

- a. Pacientes cuyos registros médicos estén incompletos y aquellos en los que no se realizó estudio de madurez espermática (HBA), fragmentación de ADN y morfología estricta para asegurar integridad de los datos.
- b. Pacientes que se conozca condición médica que pueda influir significativamente en la calidad seminal (ya sea de carácter endocrina, congénita, infecciosa u oncológica).
- c. Pacientes bajo tratamientos con medicamentos que pueden afectar la calidad del semen como antibióticos o esteroides.

3.6. Metodología

Las variables analizadas fueron tomadas del análisis seminal de cada paciente, se realizaron pruebas macroscópicas (volumen, licuefacción, viscosidad, pH y color) y microscópicas (concentración, número total de espermatozoides, motilidad espermática, progresión espermática y morfología) utilizando los límites de decisión proporcionados por la OMS en el 2021.

3.6.1. Análisis macroscópico

3.6.1.1. Volumen

Se pesó el frasco estéril etiquetado en una balanza para, posteriormente volver a pesar el frasco una vez contenido el líquido seminal. Se calcula el volumen seminal restando el valor del recipiente vacío con el valor del recipiente que contiene la muestra, resultando en la diferencia de peso. Este se expresa en ml.

3.6.1.2. Licuefacción

Se dejó en reposo la muestra durante 15 a 30 minutos una vez tomada esperando alcance un estado homogéneo. En los casos en los que no se dio una licuefacción homogénea, se esperó hasta los 60 minutos para que termine su licuefacción. De no ser así, se reportó como licuefacción incompleta y se licuó de forma mecánica con el uso de agujas de 18/19.

3.6.1.3. Viscosidad

La viscosidad del eyaculado se estimó aspirando semen suavemente con el uso de una pipeta de 3 ml estéril y luego dejando caer el contenido devuelta al envase. Cuando se evidenciaba que el semen caía de gota a gota este se reportaba con viscosidad normal. En los casos en los que el semen formaba un hilo de una longitud mayor a 2 cm, se reportaba con viscosidad aumentada.

3.6.1.4. pH

El pH se midió después de la licuefacción y viscosidad, colocando 5 µl de semen en una tira reactiva de pH Accu-Tell®, AccuBioTech Co., China

3.6.1.5. Color

Se observó la apariencia del eyaculado y se registró el color de este clasificando entre amarillo, blanco, opalescente o traslucido.

3.6.2. Análisis microscópico

3.6.2.1. Concentración de espermatozoides

La concentración espermática se contó en una cámara de Mackler colocando 5 µl de la muestra y utilizando un microscopio Olympus serie CH, Life Science Solutions a objetivo de 200X. Se contó 10 cuadrantes en línea vertical. El conteo final fue la concentración de espermatozoides por mililitro.

3.6.2.2. Número total de espermatozoides

Una vez que se registró el volumen en ml y la concentración de espermatozoides se pudo calcular el número total de espermatozoides presentes en el eyaculado multiplicando ambos valores. Se registró el mismo mediante a la fórmula:

Número Total de espermatozoides: (Volumen en mL) x (Concentración de espermatozoides)

3.6.2.3. Motilidad espermática

El conteo de motilidad se realizó en la misma cámara de Mackler. Se realizó entre dos a tres réplicas para determinar el porcentaje de espermatozoides motiles y no motiles presentes en un cuadrante vertical u horizontal. El resultado se expresó mediante una regla de tres:

$$\frac{\text{Número de espermatozoides mótiles}}{\text{Número de espermatozoides mótiles} + \text{Número espermatozoides no mótiles}} \times 100$$

3.6.2.4. Progresión espermática

La progresión espermática se clasificó en la cámara de Mackler analizando los espermatozoides motiles y su tipo de progresión entre A, B y C. Se registró en porcentaje cada valor.

- Progresión A: se registró aquellos espermatozoides de nado veloz que se trasladaron de un cuadrante a otro en menos de 5 segundos.

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides progresión A}}{\text{Número de espermatozoides mótiles}} \times 100$$

- Progresión B: Se anotaron los espermatozoides que se trasladaban de un sitio a otro con movimiento activo y lineal, independiente a su velocidad.

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides progresión B}}{\text{Número de espermatozoides mótiles}} \times 100$$

- Progresión C: se contaron aquellos espermatozoides con motilidad in situ, movimiento sin desplazamiento o nado en círculos pequeños.

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides progresión C}}{\text{Número de espermatozoides mótiles}} \times 100$$

3.6.2.5. Morfología estricta Tygerberg

Para el análisis de morfología se realizó un frotis del eyaculado y tinción según el método Diff-Quik (Sperm Morphology Staining Kit Diff-Quik Rapid Staining Method. BRED Life Science, CAT: BRED-015, China)

3.6.2.5.1. Frotis del eyaculado

1. Se rotuló la lámina con nombre del paciente y fecha en la que se realizó el frotis
2. Dependiendo de la concentración espermática, se colocó de 5 μ l a 10 μ l de muestra
3. El frotis se realizó mediante técnica de emplumado; con la asistencia de una placa deslizadora en un ángulo de 45° se movió hasta ponerse en contacto con la muestra y correr por todo el borde. Luego, se deslizó la placa hacia atrás lentamente por un segundo, a lo largo de la lámina portaobjeto para realizar frotis.
4. Se secó lámina al aire antes de fijar y teñir.

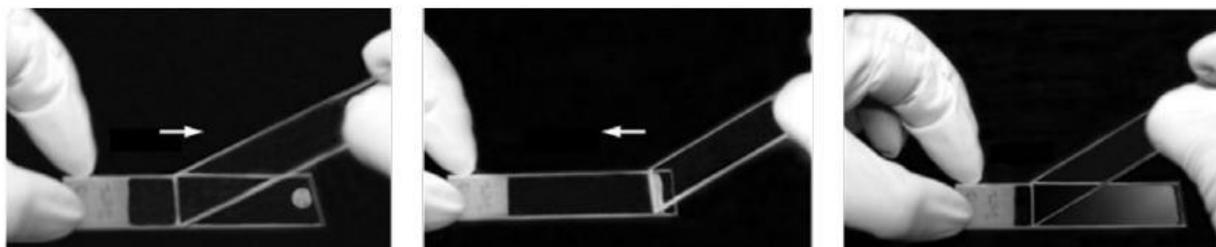


Figura 6. Técnica de frotis recomendada por la OMS (C. Brazil, 2021).

3.6.2.5.2. Tinción

La tinción se realizó siguiente las instrucciones del fabricante.

1. Se fijó la placa en metanol por alrededor de seis segundos.
2. Luego, se sumergió la placa en la solución I de tonalidad roja del kit por seis segundos. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó en agua destilada por otros seis segundos.
3. Por último, se sumergió la placa en la solución II de tonalidad morada del kit por seis segundos. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó en agua destilada por otros seis segundos.
4. Se dejó secar al aire antes de observar morfología en microscopio.

3.6.2.5.3. Observación según criterios Kruger-OMS 2021

1. Se evaluaron todos los espermatozoides presentes en cada campo, moviendo el microscopio de un campo a otro.
 - Se evaluaron únicamente los espermatozoides intactos (aquellos con cabeza y cola). No se incluyeron células inmaduras en el conteo.
 - Las cabezas sin cola se contaron por separado y se reportaron en el caso de ser mayores al 20% de los espermatozoides.
 - No se evaluaron los espermatozoides superpuestos, únicamente se verificó si todos los campos mostraban este problema y se reportó.
2. Se evaluaron al menos 200 espermatozoides para obtener un bajo error de muestreo. Se calculó la proporción (porcentaje).
3. Se contó el número de espermatozoides normales y anormales en las cuatro regiones con la ayuda de un contador de laboratorio, y se calcularon las proporciones de las formas normales y anormales en las diferentes regiones.

3.7. Pruebas avanzadas

3.7.1. Madurez Espermática: Prueba HBA

Se utilizó el kit de placas de ensayo HBA Sperm-Hyaluronan Binding Assay (HBA® Sperm-Hyaluronan Binding Assay, CAT: BCT-HBA-10. CooperSurgical, Costa Rica) para el análisis.

1. En una cámara de ensayo (porta objeto) se colocó 10 µl de la muestra de semen en el centro de la placa.
2. Inmediatamente, se colocó el cubreobjetos cuadriculado de CELL-VU, evitando la inclusión de burbujas de aire al apoyarlo desde el borde derecho formando una bisagra y bajando lentamente el borde opuesto hasta que la placa entre en contacto con la gota y el círculo central completamente cubierto de muestra.
3. Se incubó la cámara durante 10 minutos en ausencia de luz.

4. Se contaron al menos 100 espermatozoides, se reportó en porcentaje los espermatozoides que tuvieron una buena unión al ácido hialurónico que dejaron su movimiento progresista, pero mantuvieron la cola activa en movimiento. Además, se reportaron los espermatozoides no ligados que permanecieron móviles alrededor de los cuadrantes. Los espermatozoides no motiles no se tomaron en cuenta en el conteo.

$$\%Unión = \frac{\text{Espermatozoides motiles ligados}}{\text{Espermatozoides motiles ligados} + \text{Espermatozoides motiles no ligados}} \times 100$$

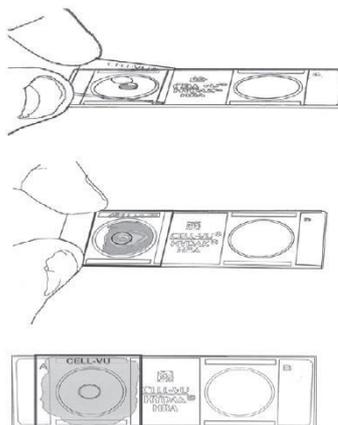


Figura 7. Técnica de ensayo HBA (CooperSurgical, 2020)

3.7.2. Fragmentación de ADN: Técnica Dispersión de la Cromatina (SCD)

Se realizó la técnica de dispersión de la cromatina según el protocolo establecido por el kit SpermFunc DNAf (SpermFunc ® DNAf - Sperm DNA Fragmentation test kit Sperm Chromatin Dispersion: SCD method, CAT: BRED-002. BRED Life Science, China)

3.7.2.1. Preparación de Reactivos

1. Gel de bajo punto de fusión: Se colocó el tubo que contenía el gel de bajo punto de fusión en un baño seco a 80°C durante 20 minutos hasta su completa disolución. Luego, se transfirió este tubo a una incubadora a 37°C para su uso, donde permaneció al menos 5 minutos antes de su uso.
2. Medio de Dilución del Semen: Se prepararon 5 ml de medio Global Total con Hepes (Global Total con Hepes CAT: LGTH-100. CooperSurgical, Costa Rica.) y un 10% de albúmina (4.5 ml del medio con 0.5 ml de albúmina). Este medio se mantuvo a 37°C para su uso en muestras frescas.

3. Metanol al 100%: Se colocó metanol al 100% en una cubeta de tinción, manteniéndolo a temperatura ambiente antes de su uso. Después de su uso, el metanol en el envase de tinción se almacenó en refrigeración para posteriores procedimientos (máximo 3 usos antes de ser renovado).
4. Metanol al 90%: Se preparó metanol al 90% en un tubo de 50 ml con tapa azul y se vació en una cubeta de tinción, manteniéndolo a temperatura ambiente antes de su uso. Después de su uso, el metanol en el envase de tinción se almacenó en refrigeración para posteriores procedimientos (máximo 3 usos antes de ser renovado).
5. Metanol al 70%: Se preparó metanol al 70% en un tubo de 50 ml con tapa azul y se vació en una cubeta de tinción, manteniéndolo a temperatura ambiente antes de su uso. Después de su uso, el metanol en el envase de tinción se almacenó en refrigeración para posteriores procedimientos (máximo 3 usos antes de ser renovado).
6. Solución A y B: Se vaciaron las soluciones A y B del kit en dos cubetas de tinción, manteniéndolas a temperatura ambiente antes de su uso. Después de su uso, estas soluciones en el envase de tinción se almacenaron en refrigeración para posteriores procedimientos (máximo 5 usos antes de ser renovadas).
7. Agua destilada: Se dispuso agua destilada en una pipeta.

3.7.2.2. Preparación de la Muestra de Semen

1. Para el inicio de la prueba, la muestra de semen tuvo una concentración de espermatozoides de $5-10 \times 10^6/\text{ml}$. Para ello, si fue necesario, se diluyó la muestra con Medio Global Total con Hepes al 10% de albúmina hasta llegar a la concentración requerida.
2. Si no se realizó la prueba el mismo día de recolección de la muestra, estas se preservaron a -20°C o -80°C hasta 15 días después de su toma. Para ello, se mezcló completamente el reactivo preservante Sperm Chromatin Dispersion (SCD) con el semen sin diluir, en una relación de 1:3 de muestra y reactivo respectivamente (100 μl de muestra y 300 μl de reactivo). Esta relación de volumen se mantuvo siempre. Antes de usar muestras criopreservadas, estas se equilibraron a 37°C y se llevaron a una concentración de espermatozoides de $5-10 \times 10^6/\text{ml}$, diluyéndolas si fue necesario como se describió anteriormente.

3.7.2.3. Procesamiento de Muestra

1. Se dispensaron 60 μ l de la muestra de semen diluida a una concentración de $5 \cdot 10^6$ /ml en el tubo que contenía el gel de bajo punto de fusión ya disuelto y a 37°C. Este tubo con la muestra de semen se continuó incubando a 37°C para su uso siguiente.
2. Se tomó la placa pre-cubierta del refrigerador (estas se encontraban a 2-8°C por al menos 5 minutos antes de su uso) y se colocaron inmediatamente 30 μ l de la suspensión del semen que se encontraba en el tubo con el gel de bajo punto de fusión y a 37°C.
3. Se cubrió la placa revestida (que contenía la muestra de espermatozoides) con el cubreobjeto de manera rápida y suave (sin presionar ni producir burbujas de aire).
4. La placa formada se almacenó a 2-8°C por 5 minutos en el refrigerador para que el gel nuevamente se solidificara.
5. Se retiró la placa del refrigerador y se removió el cubreobjeto de esta, empujándolo hacia un lado hasta que sobresaliera y se pudiera tomar del borde para su remoción total de manera horizontal (sin levantarlo).
6. La placa revestida ya sin el cubreobjeto se introdujo verticalmente en el envase que contenía la solución A y se incubó en la misma por 7 minutos, a temperatura ambiente (20-28°C).
7. Se sacó la placa de la solución A y se limpió la parte trasera y lateral de la misma con papel filtro, sin tocar la parte delantera (donde se encontraban los espermatozoides).
8. Se introdujo la placa verticalmente en el envase que contenía la solución B y se incubó en la misma por 25 minutos, a temperatura ambiente.
9. Se sacó la placa de la solución B y se limpió la parte trasera y lateral de la misma con papel filtro, sin tocar la parte delantera (donde se encontraban los espermatozoides).
10. Se introdujo la placa de manera horizontal en una bandeja con agua destilada por 5 minutos, removiendo el agua 1 o 2 veces durante este paso.
11. Se retiró la placa y se limpió la parte trasera y lateral de la misma con papel filtro, sin tocar la parte delantera (donde se encontraban los espermatozoides).

3.7.2.4. Proceso de Fijación y Tinción de Espermatozoides

1. Se introdujo la placa verticalmente en el envase que contenía el metanol al 70% y se mantuvo ahí por 2 minutos. Luego, se retiró del alcohol y se limpió la parte trasera y lateral de la misma con papel filtro.
2. Se introdujo la placa verticalmente en el envase que contenía el metanol al 90% y se mantuvo ahí por 2 minutos. Luego, se retiró del alcohol y se limpió la parte trasera y lateral de la misma con papel filtro.
3. Se introdujo la placa verticalmente en el envase que contenía metanol al 100% y se mantuvo ahí por 2 minutos. Luego, se retiró del alcohol y se limpió completamente al aire.
4. Se dispensaron 15-20 gotas de tinción de Wright sobre la placa y luego 30–40 gotas del buffer de Wright, suavemente (se colocó el doble de gotas del buffer en comparación con las de tinción).
5. Se sopló la mezcla suavemente con el aire del bulbo de una pipeta sin destruir la tensión superficial hecha por la tinción.
6. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
7. Se lavó la placa suavemente con agua destilada.
8. Se secó al aire.

3.7.2.5. Observación de Espermatozoides

1. Se identificó y clasificó el tamaño del halo de los espermatozoides según el criterio establecido por BRED Life Science según el kit SpermFunc para la prueba de dispersión de la cromatina para fragmentación de ADN. (Tabla 2).



Figura 8. Diámetro de halo en fragmentación de ADN (Bred LifeScience, 2024)

Tabla 2. Clasificación de halos en la fragmentación de ADN

TIPO DE HALO	DESCRIPCIÓN	IMAGEN
Halo Grande	$B > A$	 <p>(Fuente: La autora, 2024)</p>
Halo Mediano	$A > B > 1/3A$	 <p>(Fuente: La autora, 2024)</p>
Halo pequeño	$B < 1/3A$	 <p>(Fuente: La autora, 2024)</p>
Sin halo	No se muestra ningún halo alrededor de la cabeza de espermatozoide	 <p>(Fuente: La autora, 2024)</p>
Degradado	No muestran halo y presentan núcleo irregular.	 <p>(Fuente: La autora, 2024)</p>

2. Se calculó el índice de fragmentación de ADN espermático utilizando la fórmula:

$$\% IFA = \frac{(\text{Espermatozoides con halo pequeño} + \text{Halo degradado} + \text{Sin halo})}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3. Se aseguró que el conteo total de espermatozoides observados fuera mayor a 500 para asegurar fiabilidad del porcentaje reportado.

3.8. Evaluación de Índices de morfología espermática

3.8.1 Índice de teratozoospermia (TZI)

1. Se observaron 200 espermatozoides en los que se registró un defecto por cada espermatozoide según su anomalía entre las categorías de cabeza, pieza media, cola y residuo citoplasmático, se realizó la suma de estos para obtener un total de defectos.

$$\text{Suma total de los defectos} = \text{Cabeza} + \text{Cuello} + \text{Cola} + \text{Residuos citoplasmáticos}$$

2. Este total fue dividido por el número de espermatozoides anormales que se contaron.

$$TZI = \frac{\text{Suma total de defectos}}{\text{Número de espermatozoides anormales registrados}}$$

3. De la misma forma, se reportó el valor de defectos de cabeza, cuello, cola y residuo citoplasmático en porcentaje al número entero más cercano.

3.8.2. Índice anomalías múltiples (MAI)

1. El índice de anomalías múltiples se calculó anotando distintas anormalidades presentes en la cabeza, pieza media y pieza principal del espermatozoide mediante la observación de 200 espermatozoides.
2. Se subdividieron de la siguiente manera:

Cabeza presenta 7 anormalidades: Cónico, delgado, microcéfalo, macrocéfalo, múltiples, anormalidad región post acrosomal, anormal o ausencia del acrosoma.

Pieza media presenta 3 anormalidades: Gota citoplasmática, delgado y doblada.

Pieza principal: presenta 5 anormalidades: Ausente, corta, irregular, enrollada y múltiple.

3. Cada una de estas subdivisiones se sumaron y reportaron como una suma total de defectos.

*Cabeza = Cónico + Delgado + Microcéfalo + Macrocéfalo + Múltiples
+ Anormalidad región post acrosomal + ausencia del acrosoma*

Pieza media = Gota citoplasmática + Delgado + Doblado

Pieza Principal = Ausente + Corta + Irregular + Enrollada + Múltiple

Suma total de defectos = cabeza + cuello + cola

1. Una vez reportada las anormalidades entre los subgrupos, se calculó el índice sumando cada división como se demuestra en la fórmula a continuación.

$$MAI = \frac{\text{Suma total de defectos}}{\text{Número de espermatozoides anormales registrados}}$$

3.8.3. Índice de deformidades espermáticas (SDI)

1. Para la clasificación morfológica del índice de deformidad del espermatozoide se emplearon los criterios de Tygerberg, los mismos que se utilizan para la morfología estricta (Aziz et al; 1996), para el subgrupo de cabeza, mientras que, en la pieza media, cola y residuo citoplasmático se registró un solo defecto por espermatozoide.

$$\begin{aligned} \text{Cabeza} = & \text{Amorfo} + \text{Cónico} + \text{Piriforme} + \text{microcéfalo} + \text{macrocéfalo} \\ & + \text{múltiples} + \text{anormal o ausencia del acrosoma} \end{aligned}$$

2. Este índice se obtuvo al dividir el número de defectos por el número total de espermatozoides, no solo los anormales.

$$SDI = \frac{\text{Suma total de defectos}}{\text{Número total de espermatozoides registrados (normales y anormales)}}$$

3.9 Análisis estadístico

Los datos recolectados se analizaron en el software Statsgraphics Centurion 19 (Versión 19.6.04) para el desarrollo de pruebas estadísticas que evalúen la calidad y consistencia de los datos, identificando posibles sesgos.

Capítulo IV

4. Resultados y Discusión

4.1. Resultados

Los datos recolectados fueron segregados según los criterios de exclusión descritos en la metodología de esta investigación, agrupando en dos grupos, de control e infértil, a los pacientes según se haya registrado en su historia clínica la confirmación de su fertilidad bajo el prospecto de que hayan tenido hijos en los últimos 5 años. Dado a que se compilaron pacientes a partir de enero a mayo del presente año, el número se vio reducido a 25 pacientes infértiles y 5 pacientes del grupo control, una vez discriminados por las condiciones de exclusión.

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se comprobó inicialmente que los datos recolectados de las variables dependientes no seguían una distribución normal mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, la cual se escogió debido a su recomendación para el análisis de conjuntos de datos pequeños con menos de 50 observaciones. Se analizaron las hipótesis de normalidad bajo un nivel de significancia de 0,05 y se encontró que los datos no cumplían con este supuesto. De igual manera, se confirmó que no había homocedasticidad entre las varianzas mediante prueba de Levene's. Debido a la falta de normalidad y homocedasticidad, las pruebas paramétricas tradicionales que asumen distribuciones normales y varianzas homogéneas no son apropiadas. Por lo tanto, se optó por analizar las medianas de las variables, ya que las medianas son menos sensibles a los efectos de la no normalidad y la homocedasticidad, proporcionando una medida de tendencia central más robusta en estas condiciones.

A continuación, se demostró las diferencias significativas obtenidas entre las medianas de las variables analizadas en el registro clínico y examen seminal entre el grupo control y el grupo infértil.

Tabla 3. Diferencias significativas entre variables del registro clínico

REGISTRO CLÍNICO	VARIABLES	CONTROL	INFÉRTEL	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
	EDAD	39.00	36.00	3.00
	IMC	26.40	25.90	0.50

En la Tabla 3. se registró la edad y el índice de masa corporal (IMC) del grupo control e infértil y, se refleja que no existen diferencias significativas de la muestra tomada. Esto puede atribuirse al hecho de que no se consiguió un número significativo de muestras para el grupo control, por motivo a que la mayoría de los pacientes que asistieron a la clínica de medicina reproductiva para solicitar espermogramas completos, inicialmente sospechaban de infertilidad al no lograr concebir, considerando que el factor femenino ya fue previamente analizado y descartado como causa de la infertilidad en la pareja.

Tabla 4. Diferencias significativas entre variables del análisis seminal

	VARIABLES	CONTROL	INFÉRTEL	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
ANÁLISIS SEMINAL	VOLUMEN SEMINAL	1.40	3.00	-1.60
	CONCENTRACIÓN x ml	28.00	25.00	3.00
	CONCENTRACIÓN TOTAL	39.20	63.00	-23.80
	MOTILIDAD (%)	51.00	60.00	-9.00
	TOTAL MOTILES	16.46	37.44	-20.98
	P A	19.00	6.00	13.00
	P B	75.00	77.00	-2.00
	PC	22.00	10.00	12.00
	HBA	68.00	73.00	-5.00
	IFA	14.00	16.00	-2.00
	OMS (%)	3.00	2.00	1.00

En la Tabla 4. se encontró relevancia en la diferencia significativa de la variable del porcentaje de progresión rápida A (PA) entre el grupo control e infértil puesto que el grupo de pacientes cuya fertilidad ha sido comprobada actualmente, podría indicar una relación con la

rapidez en la que los espermatozoides son capaces de movilizarse, permitiéndose así un movimiento óptimo y progresivo hasta el óvulo a fecundar.

Tabla 5. Diferencias significativas entre variables del índice de teratozoospermia

	VARIABLES	CONTROL	INFÉRTEL	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
TZI	CABEZA TZI	164.00	181.00	-17.00
	CUELLO TZI	121.00	130.00	-9.00
	COLA TZI	38.00	42.00	-4.00
	RESIDUO CITOPLASMÁTICO TZI	4.00	6.00	-2.00
	ÍNDICE TZI	1.60	1.78	-0.18

Dentro de los métodos de evaluación morfológica, el índice de teratozoospermia (TZI) destaca diferencias significativas en los defectos hallados en la sección de cabeza entre el grupo control e infértil incrementando negativamente los mismos en este último.

Tabla 6. Diferencias significativas entre variables del índice de anomalías múltiples

	VARIABLES	CONTROL	INFÉRTEL	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
MAI	CABEZA MAI	226.00	275.00	-49.00
	CUELLO MAI	139.00	152.00	-13.00
	COLA MAI	58.00	62.00	-4.00
	RESIDUO CITOPLASMÁTICO MAI	4.00	6.00	-2.00
	ÍNDICE MAI	2.42	2.40	0.02

De la misma manera, se denota en la Tabla 6. que las medianas del índice de anomalías múltiples (MAI) en el grupo infértil son mayores que en el grupo de control tanto en los defectos contabilizados en cabeza y cuello del espermatozoide.

Tabla 7. Diferencias significativas entre variables del índice de deformidades espermáticas

	VARIABLES	CONTROL	INFÉRTEL	DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
SDI	CABEZA SDI	206.00	224.00	-18.00
	CUELLO SDI	121.00	130.00	-9.00
	COLA SDI	38.00	42.00	-4.00
	RESIDUO CITOPLASMÁTICO SDI	4.00	6.00	-2.00
	ÍNDICE SDI	1.82	1.95	-0.13

Por último, el índice de deformidades espermáticas (SDI) representa la misma diferencia significativa entre los valores de mediana en ambos grupos siendo mayor con respecto al grupo infértil.

El grupo infértil muestra una tendencia de mayores anomalías en la morfología espermática, específicamente en el cuello y la cabeza, menores concentraciones de espermatozoides, y una movilidad reducida.

1.1.1. Análisis de correlación

Se llevó a cabo el análisis de correlación de Spearman dado a que las variables analizadas no siguen una distribución normal ni presentan homocedasticidad. Por ende, Spearman es la prueba ideal dado a que no es paramétrica y no requiere que los datos cumplan con la suposición de normalidad.

- **Volumen seminal y motilidad**

Se evidencia una correlación positiva moderada entre el volumen seminal y motilidad de 0.41. Esto sugiere que, a mayor volumen seminal, la motilidad tiende a ser mayor.

- **Progresión A y motilidad**

Surge una correlación de 0.53 moderada y positiva que podría indicar que una mayor cantidad de espermatozoides motiles producen una progresión motil tipo A, mayor rapidez y eficiencia en el nado espermático.

- **HBA y motilidad**

La prueba de unión HBA y la motilidad indican una correlación positiva moderada a un valor de 0.53.

- **Concentración y motilidad**

Se indica una correlación positiva moderada de 0.33 entre la concentración de espermatozoides y la motilidad, lo que indica que una mayor concentración espermática está asociada con una mejor motilidad.

- **Volumen seminal y pH**

De la misma manera, es importante resaltar que existe una relación inversamente proporcional de -0.33 entre el volumen seminal y el nivel de pH en el semen.

VOLUMEN SEMINAL		-0.05	0.41	0.30	0.30	0.29	-0.33
CONCENTRACION	-0.05		0.33	0.18	0.22	-0.09	-0.12
MOTILIDAD	0.41	0.33		0.53	0.53	-0.11	-0.28
PROGRESION A	0.30	0.18	0.53		0.18	0.02	-0.19
HBA	0.30	0.22	0.53	0.18		0.03	-0.12
IFA	0.29	-0.09	-0.11	0.02	0.03		0.25
pH	-0.33	-0.12	-0.28	-0.19	-0.12	0.25	
	VOLUMEN SEMINAL	CONCENTRACION	MOTILIDAD	PROGRESION A	HBA	IFA	pH

Figura 9. Correlación parámetros seminales y pruebas avanzadas

- **Edad y HBA**

Se demuestra una correlación negativa moderada de -0.48 que sugiere que, a mayores rangos de edad, menor será el porcentaje reportado en la prueba HBA, es decir, la capacidad del espermatozoide de unirse al ácido hialurónico.

- **Edad y morfología normal según OMS**

Se encontró una correlación moderada de -0.28, refiriéndose a una relación inversamente proporcional entre la edad y la morfología normal reportada por los criterios de la OMS.

EDAD	-0.48	0.00	-0.28
HBA	-0.48	0.19	0.11
IFA	0.00	0.19	-0.15
OMS	-0.28	0.11	-0.15
	EDAD	HBA	IFA
			OMS

Figura 10. Correlación entre edad, HBA, índice de fragmentación de ADN (IFA) y morfología normal según OMS

- **TZI Cabeza y TZI Cuello**

Existe una correlación de 0.38, siendo esta positiva y moderada, sugiere que las anomalías registradas en cabeza se asocian, a su vez, a mayores alteraciones en cuello según la clasificación de defectos del índice de teratozoospermia.

- **TZI Cabeza y TZI Cola**

Se presentó una correlación positiva baja de 0.25 que indica una relación débil pero existente entre las alteraciones de cabeza y cola en el método TZI.

- **TZI Cuello y Progresión A**

Se exhibe una correlación negativa moderada de -0.59 que propone que mientras mayor sean las anomalías observadas en el cuello, menor será el porcentaje de espermatozoides con progresión motil tipo A, rápida y de largas distancias.

- **TZI Cuello y Progresión B**

De la misma manera, se generó una correlación positiva moderada de 0,50 lo que se entiende como mientras mayor sean las anomalías del cuello mayor será el porcentaje de progresión B, lento y menos eficiente, lo que afirma el argumento de la anterior correlación.

TZI CABEZA		0.38	0.25	0.02	-0.10	-0.10	0.00	0.07	-0.26
TZI CUELLO	0.38		0.16	-0.01	-0.33	-0.38	-0.59	0.50	0.05
TZI COLA	0.25	0.16		-0.16	-0.07	-0.13	-0.39	0.19	0.02
TZI RC	0.02	-0.01	-0.16		0.11	0.04	0.16	-0.11	-0.07
MOTILIDAD	-0.10	-0.33	-0.07	0.11		0.73	0.53	-0.24	-0.37
NUMERO TOTAL MOTILES	-0.10	-0.38	-0.13	0.04	0.73		0.48	-0.20	-0.29
PROGRESION A	0.00	-0.59	-0.39	0.16	0.53	0.48		-0.82	-0.02
PROGRESION B	0.07	0.50	0.19	-0.11	-0.24	-0.20	-0.82		-0.48
PROGRESION C	-0.26	0.05	0.02	-0.07	-0.37	-0.29	-0.02	-0.48	
	TZI CABEZA	TZI CUELLO	TZI COLA	TZI RC	MOTILIDAD	NUMERO TOTAL MOTILES	PROGRESION A	PROGRESION B	PROGRESION C

Figura 11. Correlación de parámetros seminales y el índice de TZI

- **MAI Cabeza y MAI Cuello**

Existe una correlación de 0.43, siendo esta positiva y moderada, lo que sugiere que las anomalías registradas en la cabeza se asocian a mayores alteraciones en el cuello según la clasificación de defectos del índice de anomalías múltiples espermáticas (MAI).

- **MAI Cabeza y MAI Cola**

Se presentó una correlación positiva moderada de 0.39, indicando una relación existente entre las alteraciones de cabeza y cola en el método MAI.

- **MAI Cuello y Progresión A**

Se obtuvo una correlación negativa moderada de -0.55, que propone que, mientras mayor sean las anomalías observadas en el cuello, menor será el porcentaje de espermatozoides con progresión motil tipo A, rápida y de largas distancias.

- **MAI Cuello y Progresión B**

Asimismo, surge una correlación positiva moderada de 0.48, lo que se entiende como que, mientras mayor sean las anomalías del cuello, mayor será el porcentaje de progresión B, lento y menos eficiente, lo que afirma el argumento de la anterior correlación.

MAI CABEZA		0.43	0.39	-0.07	-0.14	-0.01	-0.39	0.58	-0.41
MAI CUELLO	0.43		0.40	-0.07	-0.35	-0.36	-0.55	0.48	0.06
MAI COLA	0.39	0.40		-0.23	-0.15	-0.30	-0.41	0.43	-0.19
MAI RC	-0.07	-0.07	-0.23		0.11	0.04	0.16	-0.11	-0.07
MOTILIDAD	-0.14	-0.35	-0.15	0.11		0.73	0.53	-0.24	-0.37
NUMERO TOTAL MOTILES	-0.01	-0.36	-0.30	0.04	0.73		0.48	-0.20	-0.29
PROGRESION A	-0.39	-0.55	-0.41	0.16	0.53	0.48		-0.82	-0.02
PROGRESION B	0.58	0.48	0.43	-0.11	-0.24	-0.20	-0.82		-0.48
PROGRESION C	-0.41	0.06	-0.19	-0.07	-0.37	-0.29	-0.02	-0.48	
	MAI CABEZA	MAI CUELLO	MAI COLA	MAI RC	MOTILIDAD	NUMERO TOTAL MOTILES	PROGRESION A	PROGRESION B	PROGRESION C

Figura 12. Correlación de parámetros seminales y el índice de MAI

- **SDI Cuello y Número Total de Motiles**

Se observa una correlación negativa moderada de -0.38, lo que sugiere que un incremento en las anomalías del cuello está asociado con una disminución en el número total de espermatozoides motiles.

- **SDI Cuello y Progresión A**

Se exhibe una correlación negativa moderada de -0.59, lo que indica que, a medida que aumentan las anomalías en el cuello, disminuye el porcentaje de espermatozoides con progresión tipo A, que es rápida y de largas distancias.

- **SDI Cuello y Progresión B**

Existe una correlación positiva moderada de 0.50, lo que sugiere que, mientras mayor sean las anomalías registradas en el cuello, mayor será el porcentaje de espermatozoides con progresión tipo B, caracterizada por un movimiento más lento y menos eficiente.

SDI CABEZA		0.46	0.07	0.03	-0.15	-0.01	-0.29	0.42	-0.38
SDI CUELLO	0.46		0.16	-0.01	-0.33	-0.38	-0.59	0.50	0.05
SDI COLA	0.07	0.16		-0.16	-0.07	-0.13	-0.39	0.19	0.02
SDI RC	0.03	-0.01	-0.16		0.11	0.04	0.16	-0.11	-0.07
MOTILIDAD	-0.15	-0.33	-0.07	0.11		0.73	0.53	-0.24	-0.37
NUMERO TOTAL MOTILES	-0.01	-0.38	-0.13	0.04	0.73		0.48	-0.20	-0.29
PROGRESION A	-0.29	-0.59	-0.39	0.16	0.53	0.48		-0.82	-0.02
PROGRESION B	0.42	0.50	0.19	-0.11	-0.24	-0.20	-0.82		-0.48
PROGRESION C	-0.38	0.05	0.02	-0.07	-0.37	-0.29	-0.02	-0.48	
	SDI CABEZA	SDI CUELLO	SDI COLA	SDI RC	MOTILIDAD	NUMERO TOTAL MOTILES	PROGRESION A	PROGRESION B	PROGRESION C

Figura 13. Correlación de parámetros seminales y el índice de SDI

- **TZI Cuello y MAI Cuello**

Se observó una correlación positiva alta de 0.97, lo que sugiere que ambas variables están fuertemente relacionadas, indicando que se están midiendo características similares.

- **MAI Cuello y SDI Cuello**

Se presentó una correlación positiva alta de 0.97, lo que indica que estas variables están fuertemente relacionadas, implicando que podrían estar influenciadas por factores comunes.

- **MAI Residuo Citoplasmático (RC) y SDI Residuo Citoplasmático (RC)**

Existe una correlación positiva perfecta de 1.00, lo que sugiere que estas dos variables miden la misma característica.

- **TZI Cuello y SDI Cuello**

Se presentó una correlación perfecta de 1.00, lo que indica que estas dos variables miden la misma característica dado a que tienen la misma clasificación de defectos según su metodología.

- **TZI Cuello y SDI Cabeza**

Se observó una correlación positiva moderada de 0.46, lo que sugiere que, aunque hay una relación, no es tan fuerte como las anteriores. Esto podría indicar que las variables están relacionadas, pero están afectadas por diferentes factores.

- **TZI Cabeza y MAI Cabeza**

Se generó una correlación positiva moderada de 0.38, lo que sugiere una relación entre estas dos variables, aunque no es tan fuerte como en los casos anteriores.

		0.38	0.25	0.02	0.38	0.44	0.34	0.02	0.45	0.38	0.25	0.02	0.12	0.03
TZI CABEZA														
TZI CUELLO	0.38		0.16	-0.01	0.42	0.97	0.27	-0.01	0.46	1.00	0.16	-0.01	0.18	-0.17
TZI COLA	0.25	0.16		-0.16	0.16	0.22	0.68	-0.16	0.07	0.16	1.00	-0.16	-0.05	0.11
TZI RC	0.02	-0.01	-0.16		-0.07	-0.07	-0.23	1.00	0.03	-0.01	-0.16	1.00	-0.05	0.08
MAI CABEZA	0.38	0.42	0.16	-0.07		0.43	0.39	-0.07	0.85	0.42	0.16	-0.07	0.05	-0.01
MAI CUELLO	0.44	0.97	0.22	-0.07	0.43		0.40	-0.07	0.45	0.97	0.22	-0.07	0.17	-0.23
MAI COLA	0.34	0.27	0.68	-0.23	0.39	0.40		-0.23	0.19	0.27	0.68	-0.23	-0.08	-0.12
MAI RC	0.02	-0.01	-0.16	1.00	-0.07	-0.07	-0.23		0.03	-0.01	-0.16	1.00	-0.05	0.08
SDI CABEZA	0.45	0.46	0.07	0.03	0.85	0.45	0.19	0.03		0.46	0.07	0.03	-0.01	-0.06
SDI CUELLO	0.38	1.00	0.16	-0.01	0.42	0.97	0.27	-0.01	0.46		0.16	-0.01	0.18	-0.17
SDI COLA	0.25	0.16	1.00	-0.16	0.16	0.22	0.68	-0.16	0.07	0.16		-0.16	-0.05	0.11
SDI RC	0.02	-0.01	-0.16	1.00	-0.07	-0.07	-0.23	1.00	0.03	-0.01	-0.16		-0.05	0.08
HBA	0.12	0.18	-0.05	-0.05	0.05	0.17	-0.08	-0.05	-0.01	0.18	-0.05	-0.05		0.03
IFA	0.03	-0.17	0.11	0.08	-0.01	-0.23	-0.12	0.08	-0.06	-0.17	0.11	0.08	0.03	
	TZI CABEZA	TZI CUELLO	TZI COLA	TZI RC	MAI CABEZA	MAI CUELLO	MAI COLA	MAI RC	SDI CABEZA	SDI CUELLO	SDI COLA	SDI RC	HBA	IFA

Figura 14. Correlación de parámetros seminales y los índices de evaluación morfológica de espermatozoides.

1.1.2. Análisis de Regresión Lineal

Se realizó gráficas de regresión lineal para obtener una correlación de Spearman entre cada método de morfología respectivamente para el índice de teratozoospermia, el índice anomalías múltiples y el índice de deformidades espermáticas. Se correlaciono cada anomalía tanto en cabeza, cuello y cola con el índice obtenido en cada muestra. Se obvio la correlación de la variable de residuo citoplasmático debido a que este se registra igual en los tres métodos, por ende, no influye significativamente en la comparación y selección de cuál de los tres métodos es el ideal para diagnóstico. Los resultados de la Figura 15. muestran que hay una correlación positiva fuerte entre las anomalías en el cuello de los espermatozoides y el índice TZI, lo cual es respaldado por el alto valor de P en el gráfico B ($P=0.90$). Las correlaciones entre las anomalías en la cabeza y el índice TZI, así como entre las anomalías en la cola y el índice TZI, son moderadas, con valores de P más bajos (0.76 y 0.36, respectivamente), pero aún reflejan relaciones positivas.

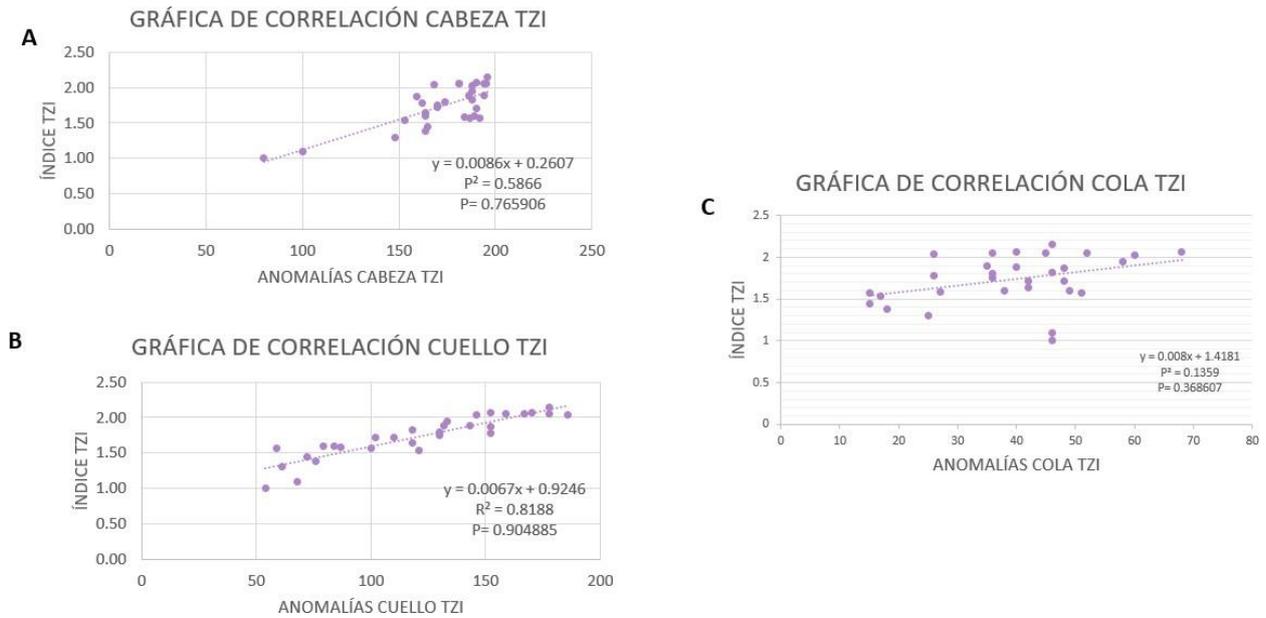


Figura 15. Gráfico de correlación de índice TZI y anomalías reportadas. (A) Representa una correlación fuerte y positiva entre anomalías de cabeza y el índice TZI. (B) Refleja una correlación fuerte y positiva entre las anomalías de cuello y el índice TZI. (C) Se registra una correlación moderada positiva entre las anomalías de cola y el índice de TZI.

Los gráficos de correlación en la Figura 16. muestran que las anomalías en la cabeza y el cuello de los espermatozoides tienen una correlación positiva fuerte con el índice MAI, reflejando una relación significativa, con valores de P de 0.794509 y 0.871473 respectivamente, según Spearman. Estos resultados sugieren que a medida que aumentan las anomalías en la cabeza y el cuello, también lo hace el índice MAI, lo que indica una asociación sólida. En contraste, las anomalías en la cola presentan una correlación positiva moderada con el índice MAI, con un P de 0.562724, lo que sugiere que, aunque existe una relación, su influencia es menos pronunciada en comparación con las anomalías en la cabeza y el cuello.

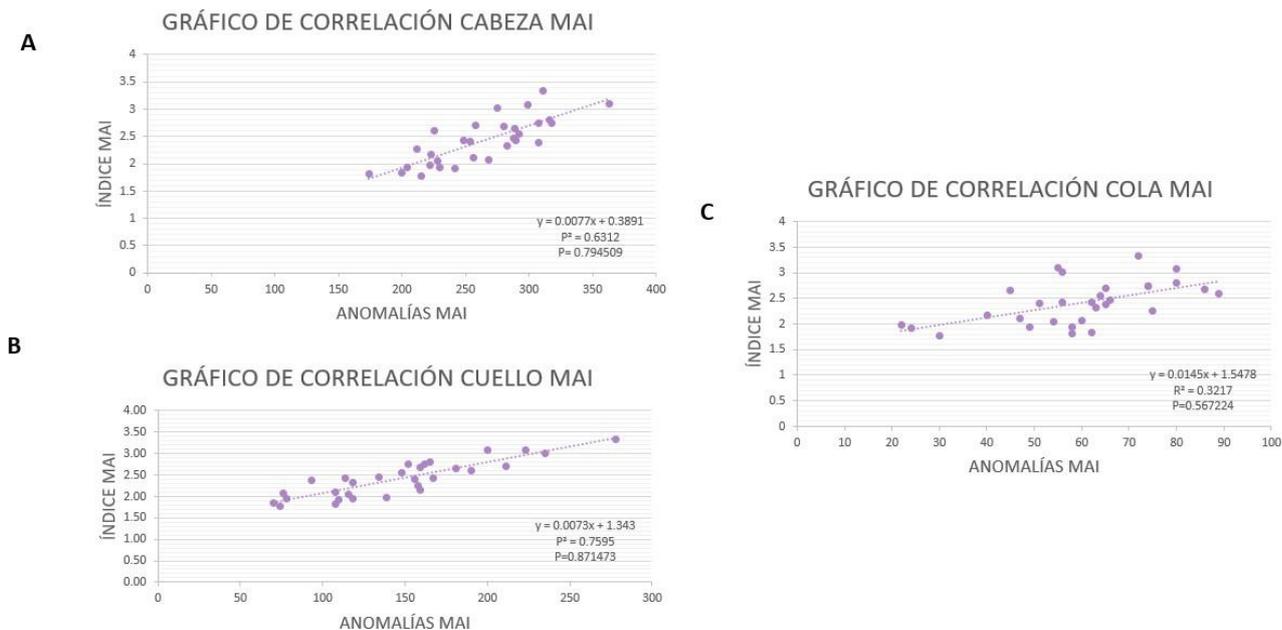


Figura 16. Gráfico de correlación de índice MAI y anomalías reportadas. (A) Representa una correlación fuerte y positiva entre anomalías de cabeza y el índice MAI. **(B)** Refleja una correlación fuerte y positiva entre las anomalías de cuello y el índice MAI. **(C)** Se registra una correlación moderada positiva entre las anomalías de cola y el índice de MAI.

La Figura 17. indica en los gráficos de correlación que las anomalías de cabeza y cuello tienen una alta correlación fuerte y positiva con el índice SDI calculado con un valor de Spearman de 0.86 y 0.85 respectivamente. Sin embargo, la correlación demostrada en cola es moderada (0.37), aunque positiva lo que refiere a que están asociados, pero de forma débil.

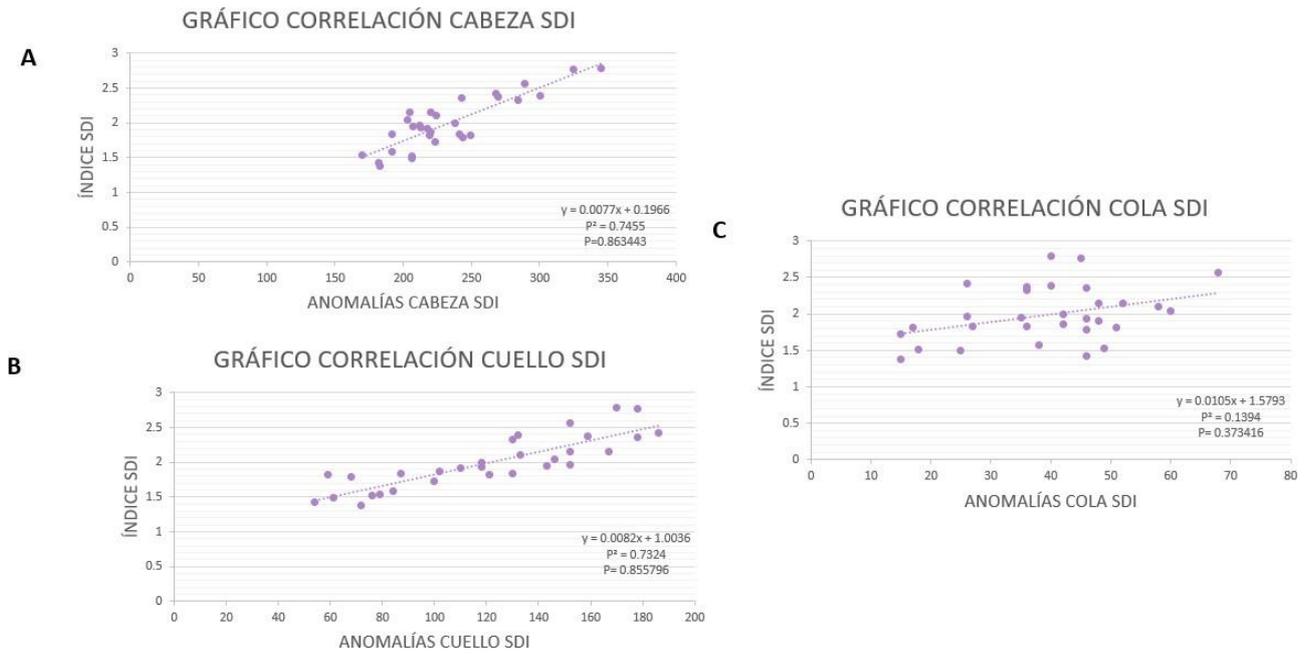


Figura 17. Gráfico de correlación de índice SDI y anomalías reportadas. (A) Representa una correlación fuerte y positiva entre anomalías de cabeza y el índice SDI. **(B)** Refleja una correlación fuerte y positiva entre las anomalías de cuello y el índice SDI. **(C)** Se registra una correlación moderada positiva entre las anomalías de cola y el índice de SDI.

4.2. Discusión

La morfología espermática es un factor para discutir en la evaluación de la calidad del semen y se sospecha si está estrechamente relacionada con otros parámetros seminales. Índices como el TZI (Índice de Teratozoospermia), MAI (Índice de Anomalías Múltiples Espermáticas) y SDI (Índice de Defectos Espermáticos) permiten una evaluación detallada de las anormalidades en diferentes partes del espermatozoide, como la cabeza, el cuello y la cola. Este análisis correlacional proporciona información valiosa sobre cómo estas anormalidades se relacionan junto a los parámetros seminales y pruebas avanzadas determinadas por la sexta edición del manual de examen y procesamiento de semen humano establecido por la Organización Mundial de la Salud en 2021.

Entre los parámetros seminales, resaltó que el volumen seminal está directamente relacionado con la motilidad, es decir, que mientras el volumen seminal sea mayor, la probabilidad de encontrar mayor motilidad espermática incrementará. Sin embargo, el volumen seminal y el nivel de pH se encuentra una correlación inversamente proporcional (-0.33) lo que corresponde al efecto que tienen las vesículas seminales en la producción del líquido seminal. Dado a que esta se encarga de generar secreción alcalina, un pH por debajo de 7.2 puede indicar una falta de producción de fluido por parte de la vesícula seminal y, por ende, un menor volumen al momento de la eyaculación (Vashisht y Gahlay, 2023).

Además, la motilidad de los espermatozoides se ve correlacionada con la progresión tipo A (0.53), este hallazgo es consistente con la idea de que la motilidad afecta también la actividad y velocidad del nado de los espermatozoides ya que la progresión tipo A se asocia con un movimiento rápido y eficiente, lo cual es fundamental para la fertilidad masculina. Asimismo, los resultados indican una correlación positiva moderada entre la concentración de espermatozoides y la motilidad (0.33). Un mayor número de espermatozoides motiles generalmente refleja una mejor capacidad para alcanzar y fertilizar el óvulo, lo que subraya Danis *et al* (2019), es esencial destacar la importancia de la morfología espermática al hablar de fertilización puesto que esta puede llegar a afectar incluso la habilidad de movimiento del espermatozoide. Por consiguiente, su capacidad para nadar a través de la zona pelúcida hasta alcanzar el óvulo.

Por otro lado, se observa que las anormalidades en el cuello del espermatozoide, evaluadas a través del índice TZI, están negativamente correlacionadas con la progresión tipo

A ($r=-0.59$) y positivamente correlacionadas con la progresión tipo B ($r=0.50$). Esto sugiere que las anomalías morfológicas en el cuello pueden afectar negativamente la eficiencia del movimiento espermático, favoreciendo un movimiento menos eficiente y lento. Este resultado refleja la funcionalidad de los centriolos y las mitocondrias que se localizan en el cuello del espermatozoide y, cómo este influye en el tipo de movimiento que genera el espermatozoide dado a que el centriolo es quien controla el batido del flagelo y las mitocondrias quienes brindan la energía necesaria para producir un movimiento lineal continuo (Avidor-Reiss, 2020).

En cuanto a las pruebas avanzadas, se destaca una correlación positiva moderada entre la capacidad de unión a ácido hialurónico (HBA) y la motilidad espermática ($r=0.53$). Este hallazgo refuerza la importancia de la madurez espermática en la funcionalidad general del semen y, determina que la prueba HBA puede ser un biomarcador fiable para evaluar la motilidad del espermatozoide en base a su capacidad de unirse al ácido hialurónico y, por consecuencia, un alto porcentaje de morfología normal (Ye *et al*, 2006). A su vez, Aitken (2006) detalla la reacción acrosómica como un procedimiento fisiológico que sucede en la cabeza del espermatozoide para facilitar la penetración de la zona pelúcida y su fusión con el ovocito. El espermatozoide debe alcanzar su madurez para que esto ocurra, por ende, que exista una posible relación entre una buena respuesta acrosómica y la madurez espermática no solo se refleja en la correlación de la prueba HBA y la motilidad, sino que también se evidencia con los resultados obtenidos entre la correlación positiva moderada de 0.38 en la morfología de cabeza del índice TZI y MAI. Puesto que ambos índices miden anomalías presentes en la cabeza y, aunque tengan clasificaciones diferentes, reportan específicamente la presencia de defectos en el acrosoma. Esto sugiere que los espermatozoides que presenten normalidad en la cabeza presentarán mayor madurez espermática, tendrán una reacción acrosómica efectiva liberando las enzimas proteolíticas que permitan aumentar su motilidad para conseguir la fecundación.

Por otro lado, Dávila *et al.* (2013) encontraron que las muestras que reportaban un valor por debajo del normal en la prueba HBA, se asimilaban a muestras de alto índice de fragmentación de ADN, lo que conlleva a una tasa mayor de aneuploidías y menor capacidad de unión del espermatozoide con la zona pelúcida. A pesar de que la prueba de HBA determine el porcentaje de madurez espermática presente en una muestra seminal, esta no se ve en aumento con la edad del paciente. Al contrario, los resultados entre la correlación de HBA, morfología normal según criterios de la OMS y la edad demuestran una relación inversamente proporcional. A medida que la edad aumenta, ambos parámetros se ven notablemente

disminuidos, aquello puede justificarse en base a los estudios de Chávez *et al* (2012) y Harris *et al* (2011) que corroboran una tendencia de disminución en la calidad seminal en hombres de edad avanzada. El aumento en la edad no solo afectaría la concentración espermática y la fragmentación de ADN sino también, se denota un menor número de espermatozoides maduros y de morfología normal que puedan lograr la fertilización por sí mismos. Igualmente, Jimbo (2022) indica que la edad paterna avanzada está asociada con mayores tasas de fracaso en intentos de embarazo natural y, en hombres mayores a 50 años, se destacan resultados negativos en embarazos y nacidos vivos aun con el uso de técnicas de reproducción asistida.

Por lo tanto, se puede destacar que estas variables han sido de vital importancia para la decisión de las técnicas a escoger en la biotecnología reproductiva, siendo una inyección intracitoplasmática (ICSI) o fecundación *in vitro* (FIV) el procedimiento a proseguir, según la capacidad espermática. Si bien en este estudio los resultados no comprobaron una correlación significativa de los parámetros analizados con el índice de fragmentación de ADN, no sería correcto omitir este factor dado a que aún es prematuro asumir una teoría definitiva, ya que la bibliografía actual presenta contradicciones significativas. Es necesario continuar investigando y analizar una muestra de datos más amplia antes de llegar a conclusiones firmes.

Según lo establecido en la metodología de la evaluación de los índices de morfología, se observa que el SDI Cuello y el TZI Cuello siguen la misma distribución de defectos anormales. Esta similitud en su enfoque es la razón principal por la cual muestran una alta correlación, ya que ambos analizan las mismas características de las anomalías en el cuello espermático. De manera similar, se aprecia una correlación perfecta observada entre las anomalías del residuo citoplasmático según el MAI y el SDI ($r=1.00$), reforzando la idea de que estos dos índices son equivalentes en la evaluación de este tipo específico de anomalías.

Asimismo, los índices morfológicos muestran fuertes interrelaciones, especialmente en el caso de las anomalías observadas en el cuello del espermatozoide. La correlación positiva alta entre el TZI Cuello y el MAI Cuello ($r=0.97$), así como entre el MAI Cuello y el SDI Cuello ($r=0.97$), indica que estos índices están midiendo características similares y, por lo tanto, podrían estar influenciados por los mismos factores subyacentes. Esta consistencia sugiere que las evaluaciones morfológicas mediante diferentes índices pueden ser intercambiables en la práctica clínica, especialmente cuando se evalúan anomalías en el cuello del espermatozoide.

Con respecto a las correlaciones analizadas entre los valores de cada índice de morfología (TZI, SDI y MAI) y las anomalías que registra cada una, se pudo obtener correlaciones significativas para este estudio. Los resultados observados en cuanto al índice de teratozoospermia sugieren que este método es eficaz para detectar anomalías del cuello debido a su alta correlación, no obstante, sus defectos en cabeza y cola no presentaron una correlación igual de significativa, en comparación con los otros métodos. Por ende, se entiende que su utilidad como método de evaluación podría estar limitada.

Por otro lado, el índice MAI presenta correlaciones fuertes tanto con anomalías en la cabeza como en el cuello, y una correlación moderada con anomalías en la cola. Esto indica que el MAI proporciona una evaluación equilibrada y sólida de las debido a sus subdivisiones presentes en cada parte del espermatozoide, lo que sugiere que es el método más completo para una evaluación integral. El índice SDI también muestra fuertes correlaciones con anomalías en la cabeza y el cuello, pero la correlación con anomalías en la cola es relativamente baja en comparación a la que presentó MAI. Dado a esta interpretación, el MAI parece ofrecer una evaluación más equilibrada y consistente en comparación con el TZI y el SDI, lo que lo convierte en el método más adecuado para una evaluación integral de las anomalías espermáticas en este estudio.

Aunque los índices morfológicos como el TZI, MAI y SDI son herramientas valiosas para evaluar las anomalías espermáticas, es fundamental reconocer que estos métodos se basan en evaluaciones subjetivas realizadas por los profesionales del laboratorio especializados en andrología. Esta subjetividad, a pesar de los esfuerzos por estandarizar los protocolos en la clínica, puede introducir variabilidad en los resultados, afectando la precisión del diagnóstico y, por ende, la selección de técnicas de reproducción asistida. Tal como menciona Auger (2010), es pertinente considerar la implementación de tecnologías avanzadas como la inteligencia artificial, que podría ofrecer un análisis más objetivo y reproducible de la morfología espermática, mejorando así la fiabilidad de las evaluaciones y optimizando los resultados clínicos.

Capítulo V

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Los diferentes índices morfológicos y los parámetros seminales sugieren que las anomalías morfológicas, especialmente en el cuello del espermatozoide, pueden tener un impacto significativo en la motilidad y la capacidad fecundante del semen.

Los índices morfológicos y los parámetros seminales sugieren que las anomalías en el espermatozoide, especialmente en su estructura, pueden tener un impacto directo en la elección de las técnicas de reproducción asistida más adecuadas.

El índice de teratozoospermia (TZI) demostró ser eficaz en la detección de anomalías en el cuello del espermatozoide, pero su utilidad en la evaluación global puede estar limitada debido a su menor eficacia en la detección de defectos en la cabeza y la cola. En contraste, el índice MAI se destacó por sus correlaciones fuertes tanto con anomalías en la cabeza como en el cuello, y una correlación moderada con anomalías en la cola, lo que sugiere que el MAI es el método más completo para una evaluación integral. El índice SDI mostró fuertes correlaciones con anomalías en la cabeza y el cuello, pero su correlación con anomalías en la cola fue relativamente baja en comparación con el MAI, lo que implica que el MAI ofrece una evaluación más equilibrada y consistente.

Aunque la correlación entre la morfología espermática, los parámetros seminales y las pruebas avanzadas no han demostrado ser significativa en este estudio, la literatura aún presenta opiniones contradictorias sobre este tema, lo que destaca la necesidad de continuar investigando. Estos resultados subrayan la importancia de seguir refinando los métodos de evaluación para asegurar que las decisiones clínicas se basen en análisis precisos y actualizados.

5.2. Recomendaciones

Para superar la limitación del tamaño de la muestra, se recomienda ampliar el periodo de estudio, permitiendo la inclusión de un mayor número de pacientes. Esto ayudará a obtener datos más representativos y reducirá el riesgo de sesgos en la selección de la muestra. De la misma manera, es crucial que se desarrollen y utilicen protocolos estandarizados para la evaluación de la morfología espermática y los parámetros seminales. Esto garantizará que los estudios sean comparables entre sí y facilitará la interpretación de los resultados en el contexto clínico.

Por último, vale la pena mencionar que los índices de morfología podrían ser evaluados bajo nuevas tecnologías para un análisis más preciso que no dependa de la subjetividad del ojo humano, como el uso de inteligencia artificial que ayude a la reproducibilidad de los resultados.

Bibliografía

- Aitken, R. J., Sutton, M., Warner, P., & Richardson, D. W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 73(2), 441–449.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0730441>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Sperm. Molecular Biology Of The Cell* - NCBI Bookshelf.
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/#:~:text=Sperm%20usually%20consist%20of%20two,\(Figure%2020%2D25\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26914/#:~:text=Sperm%20usually%20consist%20of%20two,(Figure%2020%2D25)).
- Aldahhan, R. A., Stanton, P. G., Ludlow, H., de Kretser, D. M., & Hedger, M. P. (2021). Experimental Cryptorchidism Causes Chronic Inflammation and a Progressive Decline in Sertoli Cell and Leydig Cell Function in the Adult Rat Testis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 28(10), 2916–2928.
<https://doi.org/10.1007/s43032-021-00616-0>
- Auger J. (2010). Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian journal of andrology*, 12(1), 36–46.
<https://doi.org/10.1038/aja.2009.8>
- Avidor-Reiss, T., Carr, A., & Fishman, E. L. (2020). The sperm centrioles. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 518, 110987.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110987>

- Banjoko, S. O., & Adeseolu, F. O. (2013). Seminal Plasma pH, Inorganic Phosphate, Total and Ionized Calcium Concentrations In The Assessment of Human Spermatozoa Function. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(11), 2483–2486. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6194.3585>
- Beltrán, C. (2019). Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico en la fisiología del espermatozoide del erizo de mar. El espermatozoide: una mirada desde México. México, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca.
- Blanco, S., Gottlieb, S., Grinspon, R., & Rey, R. (2015). Criptorquidia: desde la embriología al tratamiento. *Revista Médicas UIS*, 28(3), 371-380. <https://doi.org/10.18273/revmed.v28n3-2015012>
- Boeri, L., Fallara, G., Pozzi, E., Belladelli, F., Corsini, C., Raffo, M., Schifano, N., Capogrosso, P., d'Arma, A., Montorsi, F., & Salonia, A. (2022). The impact of different WHO reference criteria for semen analysis in clinical practice: Who will benefit from the new 2021 thresholds for normal semen parameters? *Andrology*, 10(6), 1134–1142. <https://doi.org/10.1111/andr.13213>
- Chávez, J., Yarlequé, J., Avalos, E., Barrientos-Marka, R., & García, M. (s. f.). *Relación entre calidad del semen y la edad*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000300007
- Chung, E., Atmoko, W., Saleh, R., Shah, R., & Agarwal, A. (2024). Sixth edition of the World Health Organization laboratory manual of semen analysis: Updates and essential take away for busy clinicians. In *Arab Journal of Urology* (Vol. 22,

Issue 2, pp. 71–74). Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/20905998.2023.2298048>

CooperSurgical. (2024). *HBA Assay*. CooperSurgical Fertility Companies.

https://fertility.coopersurgical.com/art_devices/hba-assay/

Danis, R.B., Samplaski, M.K. (2019) Sperm Morphology: History, Challenges, and

Impact on Natural and Assisted Fertility. *Curr Urol Rep* 20, 43

<https://doi.org/10.1007/s11934-019-0911-7>

Del Río, M., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil,

P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. In

Rev Int Androl (Vol. 5, Issue 4).

Du, L., Chen, W., Cheng, Z., Wu, S., He, J., Han, L., He, Z., & Qin, W. (2021). Novel

Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis. *Cells*, 10(3), 666.

<https://doi.org/10.3390/cells10030666>

Fallara, G., Cazzaniga, W., Boeri, L., Capogrosso, P., Candela, L., Pozzi, E., Belladelli,

F., Schifano, N., Ventimiglia, E., Abbate, C., Papaleo, E., Viganò, P., Montorsi,

F., & Salonia, A. (2020). Male factor infertility trends throughout the last 10

years: Report from a tertiary-referral academic andrology centre. *Andrology*,

9(2), 610-617. <https://doi.org/10.1111/andr.12947>

Flores, Javier. (2022). Evolución de las tecnologías de reproducción asistida. Una

mirada desde la biomedicina. *Inter disciplina*, 10(28), 355-368. Epub 05 de

diciembre de 2022. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485705e.2022.28.83302>

- Harris, I. D., Fronczak, C., Roth, L., & Meacham, R. B. (2011). Fertility and the aging male. *Reviews in urology*, 13(4), e184–e190.
- Herrero, M. B., Marín-Briggiler, C. I., Alaluf, M. G., Martínez, G., & Estofan, G. M. (2023). Spanish translation of the International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *JBRA assisted reproduction*, 27(2), 292–313. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20230010>
- Hirsch, I. H. (2023). Estructura del aparato reproductor masculino. Manual MSD Versión Para Público General. <https://www.msmanuals.com/es/hogar/salud-masculina/biolog%C3%ADa-del-aparato-reproductor-masculino/estructura-del-aparato-reproductor-masculino>
- Huszar, G., Ozkavukcu, S., Jakab, A., Celik-Ozenci, C., Sati, G. L., & Cayli, S. (2006). Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 18(3), 260–267. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000193018.98061.2f>
- Infante-Hernández, Beatriz, Paredes-Hernández, Ana Lucila, & Rojas-Caballero, Arnel Eduardo. (2023). Cambios morfofuncionales de los espermatozoides y factores de riesgo asociados a la infertilidad masculina. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 27. Publicado el 25 de abril de 2023. Recuperado en 29 de agosto de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552023000100032&lng=es&tlng=es.
- Jarow J., Sigman M., Kolettis P., *et al.* The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement. American Urological Association Education and

Research, (2010), [https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-infertilidad-masculina-](https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-infertilidad-masculina-S0716864014700185#:~:text=El%20factor%20masculino%20es%20el,uno%20o%20m%C3%A1s%20par%C3%A1metros%20seminales)

S0716864014700185#:~:text=El%20factor%20masculino%20es%20el,uno%20o%20m%C3%A1s%20par%C3%A1metros%20seminales.

Jimbo, M., Kunisaki, J., Ghaed, M., Yu, V., Flores, H. A., & Hotaling, J. M. (2022).

Fertility in the aging male: a systematic review. *Fertility and sterility*, *118*(6), 1022–1034. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.10.035>

Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., &

Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, *49*(1), 112–117.

[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59660-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59660-5)

Leslie, S. W., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. A. (2024). Male infertility. StatPearls -

NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>

Mawhinney, M., & Mariotti, A. (2013). Physiology, pathology and pharmacology of

the male reproductive system. *Periodontology 2000*, *61*(1), 232–251.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00408.x>

McLachlan, R. I. (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Best Practice &*

Research Clinical Endocrinology & Metabolism, *14*(3), 345-362.

<https://doi.org/10.1053/beem.2000.0084>

Moretti, E., Signorini, C., Noto, D., Corsaro, R., & Collodel, G. (2022). The relevance

of sperm morphology in male infertility. *Frontiers in reproductive health*, *4*,

945351. <https://doi.org/10.3389/frph.2022.945351>

- Morey-León, Gabriel, Puga-Torres, Tatiana, Blum-Rojas, Xavier, González-González, Manuel, Narváez-Sarasti, Alexandra, & Sorroza-Rojas, Nancy. (2020). Caracterización de la calidad del semen en hombres atendidos en un centro de reproducción asistida en Guayaquil, Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(2), 292-296.
<https://dx.doi.org/10.17843/rpmpesp.2020.372.4973>
- Olivera, Martha, Ruiz, Tatiana, Tarazona, Ariel, & Giraldo, Carlos. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436. Retrieved September 13, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008&lng=en&tlng=es.
- World Health Organization. (2021). WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2015). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025.
<https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>
- Reijo R., Alagappan R.K., Patrizio P., *et al.* Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*, 347 (1996), pp. 1290
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD: Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005, 20:2776–2783. 136.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., & Bianchi, U.

(1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. In *Reviews of Reproduction* (Vol. 4).

Sharma *et al.* *Reproductive Biology and Endocrinology* 2013, 11:66 Page 15 of 15

<http://www.rbej.com/content/11/1/66>

Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 30, 2–13.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>

Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT: Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect* 2006, 114:360–365.

SpermFunc. (s.f.). Human Sperm Morphology Analysis. BRED Life Science.

http://www.spermfunc.com/index.php/Goods/detail/id/2/cat_id/19

Sperm Morphology Stain Kit, BRED-015 Sperm Morphology Staining Kit Diff Quik

Rapid Staining Method, Sperm Morphology Stain Kit for sale, Sperm

Morphology Stain Kit price. (s. f.). BRED Life Science Technology Inc.

[https://www.malefertility-testkit.com/sale-29037892-bred-015-sperm-](https://www.malefertility-testkit.com/sale-29037892-bred-015-sperm-morphology-staining-kit-diff-quik-rapid-staining-method.html)

[morphology-staining-kit-diff-quik-rapid-staining-method.html](https://www.malefertility-testkit.com/sale-29037892-bred-015-sperm-morphology-staining-kit-diff-quik-rapid-staining-method.html)

Suede, S. H., Malik, A., & Sapra, A. (2023, 6 marzo). *Histology, spermatogenesis.*

StatPearls

-

NCBI

Bookshelf.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553142/>

Vashisht, A., & Gahlay, G. K. (2023). Understanding seminal plasma in male infertility:

emerging markets and their implications. *Andrology*.

<https://doi.org/10.1111/andr.13563>

- Wald, G., Punjani, N., Hayden, R., Feliciano, M., Dudley, V., & Goldstein, M. (2021). Assessing the clinical value of the Kruger strict morphology criteria over the World Health Organization fourth edition criteria. *F and S Reports*, 2(2), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2021.04.003>
- Walker, M., & Tobler, K. (2022). Female Infertility. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556033/>
- Ye, H., Huang, G. N., Gao, Y., & Liu, D. Y. (2006). Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(6), 1545–1550. <https://doi.org/10.1093/humrep/del008>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & Van Der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility And Sterility*, 108(3), 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>