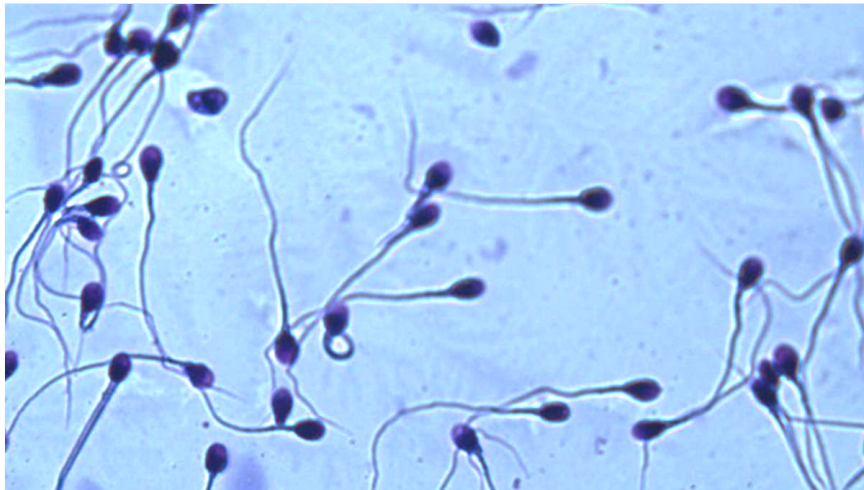


TRABAJO FIN DE GRADO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
GRADO EN MEDICINA

“Metales en semen y su influencia en los resultados de las técnicas de reproducción asistida”

Autora: Mariam Zerbaoui Zerbaoui



Tutores:

Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz

Dr. Arturo Hardisson de la Torre

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública,
Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología. Universidad de La Laguna.
Unidad de Reproducción. Hospital Universitario de Canarias

Curso 2020-2021

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Concepto.....	5
2.2. Clasificación de los metales.....	6
2.3. Análisis del semen.....	8
2.4. Técnicas de reproducción asistida.....	9
2.5. Metales y TRA.....	9
4. HIPÓTESIS.....	10
5. OBJETIVOS.....	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5.1. Muestra.....	10
5.2. Procesado de las muestras de semen para determinación de metales.....	13
5.3. Estimulación ovárica controlada.....	15
5.4. Clasificación de calidad embrionaria.....	15
5.5. Análisis estadístico.....	17
7. RESULTADOS.....	18
6.1. Ovocitos.....	18
6.2. Seminograma y presencia de metales en semen.....	18
6.3. Tasa de fertilización.....	18
6.4. Tasa de división embrionaria.....	23
6.5. Tasa de embriones de buena calidad.....	25
8. DISCUSIÓN.....	29
9. CONCLUSIONES.....	31
10. HABILIDADES Y CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS.....	32
11. AGRADECIMIENTOS.....	32
12. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ABREVIATURAS

- Pb: Plomo
- Cd: Cadmio
- Al: Aluminio
- Hg: Mercurio
- Ca: Calcio
- Mg: Magnesio
- K: Potasio
- Na: Sodio
- Fe: Hierro
- Zn: Zinc
- Cu: Cobre
- Cr: Cromo
- Co: Cobalto
- Mo: Molibdeno
- Se: Selenio
- Sr: Estroncio
- Bi: Bismuto
- V: Vanadio
- Ni: Níquel
- B: Boro
- Ba: Bario
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- TRA: Técnicas de reproducción asistida
- FIV: Fecundación in Vitro
- ICSI: Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
- TEC: Transferencia de embriones congelados
- ICP-OES: Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente
- β -hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana
- IMC: índice de masa corporal
- LH: hormona luteinizante. FSH: hormona foliculoestimulante

1. RESUMEN

Introducción: En las últimas décadas se ha producido un aumento de contaminantes ambientales que pueden afectar los resultados de las TRA.

Material y Métodos: Se analiza la asociación entre los metales en semen (Espectrometría de Masas ICP-OES) y su influencia en las TRA en 102 pacientes atendidos en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario de Canarias.

Resultados: Un 33,3% de los varones con una tasa de fertilización inferior al 75% presentan valores de Vanadio superiores a 0,7 mg/kg frente a sólo el 15,8% en el grupo con tasa superior al 75%. Los valores altos de Fe tienden hacia tasas altas de fertilización, así, el 31,6% de los que tienen una tasa de fertilización superior al 75% supera los 0,68 mg/kg frente a sólo el 20,4% en el grupo con tasa inferior al 75%. Los varones que no alcanzaron una tasa de división embrionaria del 100% presentan valores superiores de Pb ($p = 0,052$), además con un 63,6% con presencia frente al 38,5% en el grupo que alcanzó el 100%.

Conclusión: Valores de V superiores a 0,7 mg/kg se relacionan con una tasa de fertilización inferior al 75%. El Zn presenta una relación positiva con la tasa de fertilización. Cuando la tasa de división embrionaria es inferior al 100% hay valores superiores de Pb y de V. Una tasa de embriones de buena calidad se relaciona con concentraciones de Al inferior a 0,58 mg/kg.

PALABRAS CLAVE: Semen; metales; FIV; ICSI; fertilización.

1. ABSTRACT

Introduction: In the last decades there has been an increase in environmental pollutants that can affect the results of TRA.

Material and Methods: The association between the metals in semen (ICP-OES Mass Spectrometry) and its influence on ART in 102 patients treated in the Human Reproduction Unit of the University Hospital of the Canary Islands is analyzed.

Results: 33.3% of men with a fertilization rate of less than 75% have Vanadium values higher than 0.7 mg/kg compared to only 15.8% in the group with a rate higher than 75%. The high Fe values tend towards high fertilization rates, thus, 31.6% of those with a fertilization rate higher than 75% exceeds 0.68 mg/kg compared to only 20.4% in the group with a rate lower than 75%. The high Fe values tend towards high fertilization rates, thus, 31.6% of those with a fertilization rate higher than 75% exceeds 0.68 mg/kg compared to only 20.4% in the group with a rate lower than 75%. Males who did not reach an embryo division rate of 100% had higher Pb values ($p = 0,052$), in addition with 63.6% and 38.5% in the group that reached 100%.

Conclusion: V values above 0.7 mg/kg are related to a fertilization rate below 75%. Zn has a positive relationship with the fertilization rate. When the embryo division rate is less than 100% there are higher values of Pb and V. A good quality embryo rate is related to concentrations of Al less than 0.58 mg/Kg.

KEY WORDS: Semen; metals; IVF; ICSI; fertilization.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Concepto

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la esterilidad se define como la incapacidad para concebir tras uno o dos años de exposición al embarazo con un número adecuado de relaciones sexuales, 2 ó 3 cada semana, lo que equivale a relaciones cada 3-4 días, sin protección anticonceptiva adicional [1].

En las últimas décadas se ha evidenciado un aumento en la tasa de esterilidad, de tal manera que un 15% de las parejas no son capaces de conseguir una gestación durante un año. Afecta a millones de personas en edad reproductiva en todo el mundo con un impacto en sus familias y comunidades. Las estimaciones sugieren que entre 48 millones de parejas y 186 millones de individuos viven con esterilidad a nivel mundial [2].

La etiología es: masculina (40% de los casos), femenina (40%) y otro porcentaje de un 20% de causas mixtas [3].

En la mujer puede ser causada por una serie de anomalías de los ovarios, útero, trompas de Falopio y del sistema endocrino, entre otras.

En el varón la etiología es multifactorial: estrés, malformaciones genitales, factores genéticos, tóxicos como el tabaco, alcohol o drogas, obesidad, exceso de actividad física, altas temperaturas, factores médicos (medicamentos, radioterapia, quimioterapia), que producen un aumento de las ROS intracelulares. También se ha objetivado que la radiación electromagnética de un teléfono móvil puede disminuir la motilidad de los espermatozoides y aumentar la fragmentación del ADN *in vitro* [3,4,5]. Y es causada principalmente por problemas en la eyaculación, por la alteración de alguno de los parámetros de calidad del semen como son el volumen, la motilidad, la morfología, la concentración de espermatozoides y por los componentes del líquido seminal. Hay que tener en cuenta que el recuento y la motilidad reflejan la salud reproductiva del varón, sin embargo, no es el único factor que determina el éxito de la fertilización [3,4,6].

Pero existe otro factor de riesgo, de gran relevancia, que es la contaminación ambiental. La revolución industrial conlleva un aumento de contaminantes ambientales, sobre todo los xenobióticos, contaminantes o metales, que pueden ser tóxicos y afectar a la calidad espermática. Esto ha generado una gran preocupación por sus posibles efectos sobre la salud reproductiva, incluyendo el deterioro de la calidad del semen, la apoptosis de espermatozoides y daños del ADN espermático [3,7].

2.2. Clasificación de los metales

Metales pesados tóxicos. Los metales tóxicos, como el Pb, Cd, Al y Hg, tienen la capacidad de ser perjudiciales para la salud humana, incluso a bajas concentraciones, si se produce una ingesta prolongada. Su producción se ha disparado con la consecuencia del aumento de sus emisiones en el medio ambiente. A pesar del conocimiento de sus efectos nocivos para la salud humana, persiste su exposición e, incluso, en algunas zonas se ha incrementado [8].

Macroelementos. El grupo de los macroelementos está representado por macronutrientes como son el Ca, Mg, K y Na. Éstos se precisan en grandes cantidades, encontrándose presentes en los tejidos de los seres vivos [9].

Microelementos y metales traza.

- Esenciales: Un elemento esencial para el hombre es aquel cuya ausencia o deficiencia en la dieta causa alteraciones funcionales y estructurales, así como cambios bioquímicos que pueden ser estandarizados mediante la introducción de ese elemento en el organismo. Estos elementos deben de ser consumidos en cantidades adecuadas para el mantenimiento normal de las funciones fisiológicas, pero hay que tener en cuenta que si se ingieren en exceso pueden ser tóxicos. Los elementos traza, esenciales para la salud humana son: Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Mo y Se [10].
- No esenciales: Los metales no esenciales como el Sr, Bi, V, Ni, B y Ba y Li son constituyentes naturales de la corteza terrestre. La contaminación del aire, del suelo y de las aguas contribuye a la presencia de estos elementos.

Metales pesados tóxicos

El Cd y el Pb son dos de los metales tóxicos reproductivos más importantes que podrían causar una alteración en el eje gonadal hipotálamo-pituitario. Así, el Cd puede aumentar en el plasma seminal debido a la exposición crónica al tabaco; se ha demostrado que un cigarrillo puede tener hasta 1-2 μg de Cd [11] y como consecuencia de este aumento se produciría aneuploidía en gametos que puede causar esterilidad, defectos cromosómicos del líquido seminal y un mal funcionamiento del sistema reproductor masculino. Así mismo, el consumo de alimentos como champiñones y mariscos pueden contribuir también al aumento de los niveles de Cd [7,12]. Además, ejerce un efecto deletéreo sobre la calidad espermática, sobre todo por alteraciones en el proceso de espermatogénesis, ya sea por la ruptura de uniones intercelulares o por alteraciones en la concentración de testosterona. Este metal tiene una vida media de unos 25-30 años [11] y se acumula en el epidídimo.

El Pb es uno de los principales contaminantes y, al igual que otros metales, se acumula en los órganos reproductores masculinos, deteriora la calidad del semen, produce una disminución de la fertilidad, aumenta la frecuencia de aborto espontáneo y de esterilidad masculina. Y también se ha visto que inhibe las funciones espermáticas *in vitro*, aunque se desconoce todavía su mecanismo de acción [7].

Macroelementos

Los macroelementos, muy abundantes en el semen humano, desempeñan funciones esenciales en la actividad normal del semen y en su calidad. En algunos estudios se ha notificado la existencia de un desequilibrio de estos elementos en trastornos patológicos y en la esterilidad masculina [3,13,14]. El K, Ca y Zn son esenciales para la maduración y capacitación de los espermatozoides [15,16].

Microelementos o metales traza

No está claro el papel que desempeña el Cu en la capacidad reproductiva, ya que hay estudios que muestran una relación positiva entre las concentraciones sanguíneas y la motilidad espermática mientras que otros observan niveles altos de Cu en grupos estériles. Esta discrepancia en resultados puede ser debida a la actividad redox del Cu [15,17].

El Co produce necrosis de los túbulos seminíferos, y de los tejidos intersticiales, hipertrofia de las células de Leydig y degeneración de células espermáticas.

El Zn, desempeña un papel importante en el mantenimiento de las células germinales, en la progresión de la espermatogénesis y en la regulación de la movilidad espermática. Su déficit puede disminuir los niveles séricos de testosterona y afectar a la espermatogénesis. Diversos estudios han demostrado que los hombres fértiles presentan altos niveles de Zn, a diferencia de los estériles que tenían una disminución en el recuento de espermatozoides [18].

Varios estudios han llegado a la conclusión de que el Zn tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio y desempeña un papel importante en la eliminación de ROS y participa también en la producción de otras enzimas antioxidantes con el fin de la protección celular. Así, se ha objetivado que la criopreservación del semen causa estrés oxidativo, daño en el ADN espermático y apoptosis de espermatozoides, sin embargo, al añadir el Zn a las muestras de semen previo a la criopreservación, previene el daño del ADN espermático [15,19].

La mayor parte del Zn se encuentra localizado en la próstata (mayor cantidad que en la sangre) y se distribuye en riñones, hígado, músculos y corazón [4,5,20].

El Li está indicado como tratamiento de la enfermedad afectiva bipolar, pero se observó que con una concentración de $6-8 \text{ mmol}^{-1}$ es suficiente para causar un cese del movimiento del flagelo del espermatozoide, y se ha llegado a la conclusión de que inhibe la motilidad espermática *in vitro* [21].

Los factores que más van a influir en la acumulación de metales pesados en los tejidos son: la concentración en el medio ambiente y el agua y el tiempo de exposición, y otros como el pH, la temperatura, la salinidad y determinados factores intrínsecos [3].

El aparato reproductor masculino contiene una gran variedad de moléculas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (como vitaminas C y E, folato, Zn, Se) que presentan un efecto protector del daño oxidativo del ADN.

2.3. Análisis del semen

El análisis convencional de la calidad seminal, o espermiograma, es la herramienta básica de rutina que aporta información sobre el potencial reproductivo del varón, se considera la concentración espermática ($15^6 / \text{mL}$) normal entre 12 y 16 y la motilidad total (progresivos % y no progresivos %) de 40% y progresivos del 32% [22].

Al analizar el semen, se puede encontrar: ausencia completa de células espermáticas o azoospermia, disminución del número de espermatozoides u oligozoospermia, disminución de la motilidad espermática o astenozoospermia y morfología anormal o teratozoospermia [22].

La detección de metales en semen se ha realizado mediante el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES). En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generando los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático.

El equipo que se utiliza es un Espectrofotómetro de emisión atómica ICP-OES Radial Simultáneo Varian 725-ES.

Los análisis que se ofrecen incluyen prácticamente todos los elementos de la tabla periódica en una amplia variedad de muestras líquidas y sólidas.

2.4. Técnicas de reproducción asistida

La reproducción asistida es el conjunto de técnicas y tratamientos médicos de la esterilidad destinados a favorecer la gestación ante causas de esterilidad masculina, femenina o ambas, y que precisan de una manipulación de los gametos. En ellas se incluyen la fertilización *in vitro* y la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI).

La FIV se introdujo en 1978 y es una técnica que consiste en la unión del óvulo y espermatozoide en el laboratorio, una fecundación extracorpórea *in vitro* para conseguir embriones de buena calidad. En primer lugar se estimula la ovulación con gonadotropinas (vía intramuscular o subcutánea) para producir el desarrollo de múltiples folículos ováricos que serán aspirados vía vaginal, bajo visión ecográfica, para la obtención de los ovocitos. Éstos serán inseminados en el laboratorio, teniendo lugar la fertilización y el desarrollo embrionario. Posteriormente los embriones serán transferidos a la cavidad uterina.

Esta técnica es el tratamiento de elección para la endometriosis, la esterilidad de origen desconocido, esterilidad por factor masculino moderado y el factor tubárico [23].

En el ICSI se microinyecta un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro. Esta técnica está indicada para el tratamiento del factor masculino severo o ante fracasos de fertilización en FIV, cuando se disponen de pocos ovocitos o se sospecha que pueda haber mala calidad o inmadurez ovocitaria [25].

2.5. Metales y TRA

En la actualidad no se dispone de muchas publicaciones que expliquen los mecanismos de actuación de la exposición a metales tóxicos y su influencia en las TRA. Sin embargo, hay estudios que afirman que una exposición crónica a metales puede llegar a afectar el desarrollo embrionario en las TRA [24].

Así, se ha evidenciado que unos bajos niveles de Cd en el plasma seminal se asocian con un aumento en la tasa de embarazos en pacientes sometidos a técnicas FIV/ ICSI [23]. El Cd afectaría al desarrollo embrionario en el periodo preimplantatorio, reduciendo de esta manera las tasas de gestación. Además, se ha observado que presenta efectos negativos en la formación de la placenta, y que hay un aumento de partos pretérmino y cesáreas en aquellos pacientes que presentan concentraciones de Cd más altas ($Cd \geq 2 \text{ g / g de creatinina}$) [25].

Por otro lado, una alta concentración de Zn en el plasma seminal y sérico produce un efecto positivo en los resultados de las TRA [26].

En cambio, los niveles elevados de Pb se relacionan de manera negativa, tanto con los biomarcadores de la función espermática (receptor manosa, reacción acrosomal inducida por manosa), como con las tasas de fertilización, aunque se desconocen todavía los mecanismos de este proceso [27], y se ha demostrado que la exposición crónica al Pb, en niveles de 440 a 425 mg/dL, aumentan el riesgo de esterilidad, aborto espontáneo y parto prematuro. El Pb puede traspasar la placenta mediante difusión pasiva y alterar el transporte de nutrientes, afectando al crecimiento fetal y el desarrollo neurológico [28].

El Ni es un metal de transición, que también presenta unas consecuencias negativas en la salud humana. Se ha demostrado que produce una disminución en la motilidad espermática y que es teratogénico, aunque se desconocen todavía los mecanismos de toxicidad [29].

3. HIPÓTESIS

Valorar los posibles efectos de los metales estudiados en los resultados de las TRA.

4. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

- Valorar la relación entre la presencia de metales y los resultados de las TRA (FIV /ICSI): Tasa de fertilización, tasa de división embrionaria, número de embriones, embriones de buena calidad.
- Establecer el perfil de metales en semen en pacientes con buenos resultados en los ciclos de TRA.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Muestra

El estudio engloba a 102 pacientes atendidos en la Unidad de Reproducción Humana (URH) del Hospital Universitario de Canarias (HUC). Se establecieron una serie de criterios de inclusión:

- Pacientes a los que se les realizó el seminograma entre el 8 de febrero y el 16 de abril del año 2018.
- Pacientes que acepten participar y que firmen el consentimiento informado (n=120).
- El volumen de la muestra del semen tiene que ser igual o superior a 0.8 ml., para determinación de metales y seminograma en la misma muestra.

- Pacientes con determinación de metales en semen y a los que se les realizó una FIV/ICSI durante los años 2019 y 2020 (n= 92).

Los varones participantes en el estudio eran caucásicos, con edades comprendidas entre los 25 y los 52 años, con un IMC medio de $26,41 \pm 4,29$ kg / m².

Todos los pacientes fueron entrevistados por el mismo profesional y completaron un cuestionario que incluía las siguientes variables:

- Ocupación: trabajos con poca/ nula, alguna o mucha exposición a metales.
- Residencia: zonas metropolitanas, afueras de las zonas metropolitanas e islas menores.
- Alcohol: ningún consumo o consumo regular de alcohol.
- IMC:
 - Bajo peso (IMC < 18.5 kg/m²)
 - Peso normal (IMC 18.5 - 24.9 kg/m²)
 - Sobrepeso (IMC 25.0 - 29.9 kg/m²)
 - Obesidad (IMC \geq 30.0 kg/m²)
- Edad: edad fértil (entre 14 - 60 años) y avanzada edad (> 60 años).
- Tabaco, se ha codificado según el número de cigarrillos por día (CPD):
 - Fumadores y no fumadores
 - No fumador, fumador normal (1 a 10 CPD) y fumador extremo (> 10 CPD).

El 33% de los hombres eran fumadores ligeros o severos y el 66% eran bebedores ocasionales de alcohol los fines de semana o todos los días. Sólo dos de ellos reconocieron el uso de drogas. No se han encontrado diferencias entre las poblaciones de ambos grupos (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los varones evaluados				
CARACTERÍSTICAS	SEMINOGRAMA			Total (N = 102)
	Normal (N = 61)	Patológico (N = 41)	<i>p</i> -valor	
Edad (años)	38,0 ± 5,4	38,0 ± 6,2	0,994	38,0 ± 5,7
Abstinencia (días)*	3 (1,25; 4)	2 (1,5; 4)	0,569	3 (1,5; 4)
Abstinencia, n (%)			0,890	

Poca	15 (25)	10 (24)		25 (25)
Adecuada	42 (70)	28 (68)		70 (69)
Mucha	3 (5)	3 (7)		6 (6)
Peso (kg)	80,1 ± 11,0	83,1 ± 16,8	0,284	81,3 ± 13,6
Altura (m)	1,77 ± 0,07	1,76 ± 0,08	0,638	1,76 ± 0,08
IMC (kg/m ²)	25,8 ± 3,5	27,3 ± 5,2	0,094	26,4 ± 4,3
IMC, n (%)			0,025	
Bajo/normal	23 (38)	13 (32)		36 (36)
Sobrepeso	35 (58)	19 (48)		54 (54)
Obesidad	2 (3)	8 (20)		10 (10)
Fumador, n (%)	25 (41)	9 (22)	0,074	34 (33)
Alcohol, n (%)	40 (66)	27 (66)	0,977	67 (66)
Drogas, n (%)	1 (2)	1 (2)	0,775	2 (2)
Exposición metales, n (%)			0,376	
Poca	24 (40)	22 (54)		46 (45)
Media	17 (28)	8 (20)		25 (25)
Mucha	19 (32)	11 (27)		30 (30)
Esterilidad, n (%)			<0,001	
Desconocida	28 (46)	5 (12)		33 (33)
Femenino	23 (38)	2 (5)		25 (24)
Masculino	2 (3)	23 (56)		25 (24)
Mixto	7 (11)	11 (27)		18 (18)
Preservación	1 (2)	-		1 (1)
Residencia, n (%)			0,102	
Metropolitana	30 (49)	12 (29)		42 (41)
Alrededores	22 (36)	18 (44)		40 (39)
Otra isla	9 (15)	11 (27)		20 (20)
Datos muestran media ± desviación típica o frecuencia (porcentaje) excepto * Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)				

La muestra de semen se obtuvo mediante masturbación y fueron recogidas en un bote de plástico estéril. Dentro de los seis meses previos se había realizado una analítica de serología

(VDRL, Anticuerpos de Hepatitis B, C y HIV) en los que se demostró ausencia de anticuerpos. La abstinencia sexual media fue de $3,84 \pm 6,43$ días, con un rango entre 0 y 10 días.

A todas estas muestras se les ha realizado un seminograma y un análisis de metales en semen. El seminograma se llevó a cabo en el laboratorio de semen de la URH y es una de las pruebas que se le realiza al varón dentro del estudio de esterilidad y que nos permite diagnosticar la calidad seminal siguiendo los criterios de la OMS [22].

5.2. Procesado de las muestras de semen para determinación de metales

La digestión de las muestras de semen se efectúa con Multiwave GO Digestion System, Anton Paar, que consta de un rotor en el cual hay 12 reactores. En cada uno de los reactores se procesa una muestra de semen:

1. Pesar las muestras de semen en una balanza de precisión Mettler Toledo
2. Introducir en cada uno de los reactores los 0.5 ml de semen a procesar.
3. Añadir 2 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 4 ml de ácido nítrico (HNO_3).
4. El programa de tiempo utilizado para la digestión por microondas fue el siguiente: 10 minutos hasta los $70^\circ C$, 20 minutos hasta $180^\circ C$ y por último el enfriamiento durante 15 minutos hasta $50^\circ C$.
5. Tras terminar la digestión, se vierte el material digerido en un matraz de 10 ml con agua destilada.
6. Verter los 10 ml a frascos de polietileno almacenados en ausencia de luz y temperatura fría.

Y se realizó la determinación del contenido metálico de las muestras mediante Espectrometría de Masas de Plasma (ICP-OES). Las condiciones instrumentales fueron:

- Flujo de gases (flujo de gas de nebulización y flujo de gas auxiliar): 0,5 L/min.
- Potencia aproximada de radiofrecuencia: 1150 W.
- Flujo de la bomba de inyección de muestra (flujo de estabilización y flujo de análisis): 50 rpm.

Las concentraciones se calcularon mediante extrapolación de las absorbancias leídas sobre las curvas de calibrado construidas previamente a partir de disoluciones patrón de diferentes concentraciones para cada uno de los elementos.

Los límites de detección y cuantificación instrumentales se estimaron basándonos en la respuesta instrumental de los equipos. Concretamente se determinaron mediante el análisis de 15 blancos en condiciones de reproducibilidad [30]. (Tabla 2).

Tabla 2. Longitudes de onda, límites de detección y de cuantificación.		
Metal y longitud de onda	Límite Detección (LoD) (mg/l)	Límite Cuantificación (LQ) (mg/l)
Al (167,0 nm)	0.0040	0.012
B (249,7 nm)	0.0030	0.012
Ba (455,4 nm)	0.0010	0.005
Ca (317,9 nm)	0.5800	1.955
Cd (226,5 nm)	0.0003	0.001
Co (228,6 nm)	0.0006	0.002
Cr (267,7 nm)	0.0030	0.008
Cu (327,3 nm)	0.0040	0.012
Fe (259,9 nm)	0.0030	0.009
K (769,9 nm)	0.5650	1.884
Li (670,8 nm)	0.0050	0.013
Mg (279,1 nm)	0.5830	1.943
Mn (257,6 nm)	0.0020	0.008
Mo (202,0 nm)	0.0007	0.003
Na (589,6 nm)	1.0970	3.655
Ni (231,6 nm)	0.0007	0.003
Pb (220,0 nm)	0.0003	0.001
Si (185,0 nm)	0.0020	0.006
Sn (189,9 nm)	0.0110	0.027
Sr (407,7 nm)	0.0007	0.003
V (310,2 nm)	0.0010	0.005
Zn (206,2 nm)	0.0020	0.007

Puesto que muchos de los metales están relacionados, es posible realizar un análisis de componentes principales pudiendo reducirlas a cinco componentes. Estas cinco componentes explican el 74,2% de la variabilidad total. Aplicando una rotación Varimax se obtendrían los pesos de componentes rotados (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes principales

Matriz de componente rotado

Metal (mg/Kg)	Componentes				
	1	2	3	4	5
Macro Ca	,933				
Macro K	,937				
Macro Mg	,958				
Macro Na				,810	
Esencial Cu		,636			
Esencial Fe		,748			
Esencial Zn	,940				
No Esencial Al		,881			
No Esencial B					,746
No Esencial Ni		,625			
No Esencial Pb			,801		
No Esencial Sr			,794		
No Esencial V					-,685

5.3. Estimulación ovárica controlada

Se induce el desarrollo de múltiples folículos ováricos para obtener múltiples ovocitos en la aspiración folicular. El protocolo utilizado ha sido el antagonista: comienza la estimulación farmacológica con gonadotropinas, a partir del día 2 del ciclo, con la administración de una dosis variable de 225-300 mg de rFSH (Puregon ®, Organon, Francia o Gonal-F ®, Merck Serono, Francia) asociada o no con gonadotropina urinaria HMG (Menopur ®). El antagonista se añade por vía subcutánea, diariamente, comenzando cuando el folículo principal alcance 14 mm de diámetro, 0,1 mg de ganirelix o cetrorelix (Ganirelix, Orgalutran ®, Organon, Francia; Cetrorelix, Cetrotide ®, Serono, Francia). Además, la LHr (Ovitrelle ® 250 microgramos de solución inyectable en pluma precargada, Coriogonadotropina alfa, Merck Serono, Bari, Italia) fue administrada cuando los folículos tenían al menos 17 mm.

La recuperación de los ovocitos se realizó 36 horas después de la administración de LHr mediante punción transvaginal, bajo visión ecográfica.

Una vez recuperados los ovocitos, se procede a su inseminación, bien mediante FIV o ICSI, teniendo lugar la fertilización y posterior división embrionaria, llevando a cabo la transferencia embrionaria a los 3-5 días post inseminación. Los embriones sobrantes fueron vitrificados para ser transferidos en un segundo tiempo.

5.4. Clasificación de calidad embrionaria

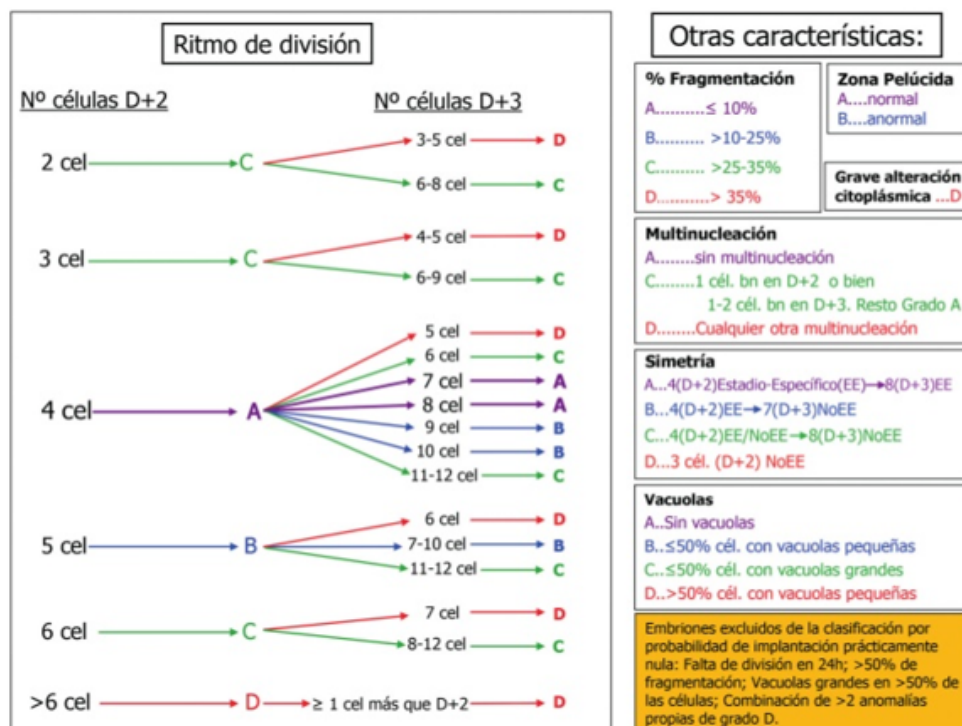
La calidad embrionaria de los embriones obtenidos se estableció según los parámetros de

ASEBIR (Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción) para los ciclos de TRA. (Fig. 1) [31].

Tasa de embriones de buena calidad: Los embriones se clasifican en función de parámetros morfológicos [31], y se clasifican en cuatro grados:

- Grado A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación (40-60%).
- Grado B: Embrión de buena calidad embrionaria con elevada capacidad de implantación (30-50%).
- Grado C: Embrión regular con una posibilidad de implantación media (10-20%).
- Grado D: Embrión de mala calidad con una posibilidad de implantación baja (<1%) por lo que no se transfieren.

Fig 1. Tabla de clasificación embrionaria según el ritmo de división . Criterios ASEBIR [31]



La tasa de fertilización es un indicador que refleja la capacidad del laboratorio para generar cigotos normales a partir de los ovocitos maduros obtenidos, y la tasa de división embrionaria

es el ritmo de división, es un parámetro con un peso importante en la tasa de implantación del embrión. Así, los embriones de 4 células en día + 2 son los que presentan mejor tasa de implantación, seguidos de los embriones de 2 células, 5 células, 3 células y 6 células.

5.5. Análisis estadístico

Para estudiar las posibles relaciones entre la concentración de los diferentes metales y las variables como el tabaquismo, IMC, la edad y días de abstinencia, se han calculado los coeficientes de correlación de Pearson. Para estudiar si existe relación entre variables categóricas (ocupación, residencia, alcohol, drogas, seminograma) o categorizadas (IMC, edad, tabaco, volumen de semen, concentración de espermatozoides, número de células redondas), se realizan contrastes de Chi cuadrado de independencia de variables.

En el análisis de las relaciones entre las concentraciones de metales y variables dicotómicas se han realizado contraste de medias independientes a través de t de student. Y para las variables independientes con más de dos niveles (ocupación y residencia) y/o combinando más de una variable independiente, se ha realizado un estudio ANOVA.

Se empleó SPSS V 25 (IBM SPSS Statistics). Se utilizó regresión logística con el método de selección de variable hacia atrás de Wald. Se incluyen las curvas ROC así como el área bajo dicha curva (AUROC). Se consideró significativo un valor de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Ovocitos

El número de ovocitos varió entre 1 y 27, siendo la mediana 6 ovocitos por punción. El 25% de las punciones superó los 11 ovocitos (hay 9 en las que se obtienen 20 ó más ovocitos) y un 25% con un número inferior o igual a 4 ovocitos (4 ovocitos es la moda, en 21 punciones), y encontrando 15 punciones con 3 ó menos ovocitos.

En 3 de las 96 punciones no se obtuvieron ovocitos maduros. Ambas variables, número de ovocito/ovocitos MII están altamente correlacionadas positivamente ($r = 0,948$; $p < 0,001$).

El número de ovocitos obtenidos está inversamente relacionado con la edad de la mujer ($r = -0,288$, $p = 0,004$) y directamente relacionado con el IMC ($r = 0,253$, $p = 0,015$).

6.2. Seminograma y presencia de metales en semen

De los 92 varones que realizaron una TRA, 47 (51,1%) presentan un seminograma normal, mientras 45 (48,9%) patológico. Además, hay 58 (63,0%) que presentan concentración o recuento normal frente a 34 (37,0%) patológico.

Aunque no es objetivo del presente trabajo, hemos encontrado que en las muestras de semen no se han detectado metales como el Co, Mo, Mn, Ba y el Li, mientras que la totalidad de las muestras de semen contenían Ca, K, Na y Zn, y el resto de los metales solo estaban en algunos varones.

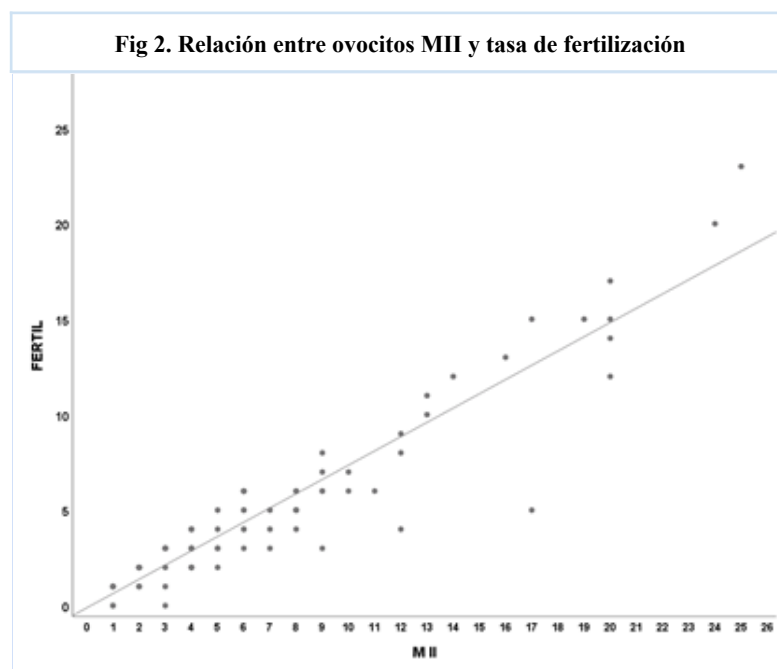
Los varones con un seminograma normal presentan Bo y Ca en semen y, cuando la concentración es normal, tienen Fe, Ca y Zn. La abstinencia sexual se relaciona con un aumento de la concentración de Mg y Zn

6.3 Tasa de fertilización

Teniendo en cuenta que la tasa de fertilización se define sobre el grupo de ovocitos maduros MII, tuvimos un total de 93 intervenciones inicialmente, si bien en una de ellas, el marido no pudo recoger la muestra de semen, aun cuando había 4 ovocitos maduros. Por este motivo se utilizarán 92 intervenciones para clasificarlas en función de la tasa de fertilización, las cuales se corresponden con 62 parejas.

Se realiza una división en dos grupos, usando la mediana (74,34%) tomando como punto de corte el 75%. ($\geq 75\%$ buena calidad; $< 75\%$ baja calidad). Según esta clasificación: 38 (41,3%) tendrán buena calidad.

También se puede observar que no existen diferencias significativas entre la tasa de fertilización y las variables estudiadas, excepto la variable de la técnica utilizada ($p=0,018$). El número de ovocitos MII y la tasa de fertilización están altamente correlacionados positivamente ($r = 0,938$; $p < 0,001$). La diferencia media entre MII y fertilizados es de $1,87 \pm 2,08$, variando entre 0 y 12. En un total de 30 punciones (32,3%) el número de ovocitos fertilizados coincidió con el número de ovocitos MII. En 15 (16,1%) se redujo en una unidad y en 19 (20,4%) en dos unidades. La mediana fue de 2 (0; 3) y solo en 7 (7,7%) punciones se superó la diferencia de 5 ó más unidades (Fig. 2).



Entre todos los metales destaca el efecto del V. El grupo con tasas de fertilización superiores al 75% presenta valores inferiores de V frente a los que tienen tasas inferiores al 75% ($p = 0,039$). Así, un 33,3% de los que tienen tasas de fertilización inferiores al 75% presentan valores de V superiores a 0,7 mg/kg frente a sólo el 15,8% en el grupo con tasa superior al 75% ($p = 0,048$) (odds ratio = 2,67 IC_{95%} 1,01; 7,52) (es decir, valores de V superiores a 0,7 mg/kg tendrán un 2,67 veces más de probabilidad de presentar una tasa inferior al 75% que sí tienen valores inferiores a 0,7 mg/kg) (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de la Tasa de fertilización				
CLASIFICACIÓN TASA DE FERTILIZACIÓN				TOTAL (N = 92)
	< 75% (N = 54)	≥ 75% (N = 38)	p-valor	
Mujer				

Edad	34,9 ± 3,81	34,4 ± 4,40	0,448	34,7 ± 4,05
IMC	23,9 ± 3,64	23,6 ± 3,19	0,232	23,8 ± 3,44
Hombre				
Edad	38,2 ± 5,47	37,4 ± 5,59	0,511	37,9 ± 5,50
IMC	25,4 ± 3,06	25,8 ± 3,34	0,295	25,6 ± 3,17
Seminograma			0,835	
Normal	27 (50,0)	20 (52,6)		47 (51,1)
Patológico	27 (50,0)	18 (47,4)		45 (48,9)
Concentración			0,668	
Normal	33 (61,1)	25 (65,8)		58 (63,0)
Patológico	21 (38,9)	13 (34,2)		34 (37,0)
Técnica			0,018	
FIV	10 (18,5)	1 (2,6)		11 (12,0)
ICSI y Mixto	44 (81,5)	37 (97,4)		81 (88,1)
METALES ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Co	-	-		-
Mo	-	-		-
Cr	2 (3,7)	1 (2,6)	0,776	3 (3,3)
Cu	52 (96,3)	34 (89,5)	0,226	86 (93,5)
Fe	52 (96,3)	38 (100)	0,510	90 (97,8)
Zn	54 (100)	38 (100)		92 (100)
Mn	-	-		-
Cu (mg/kg)*	0,53 (0,36; 0,92)	0,53 (0,33; 0,74)	0,194	0,53 (0,35; 0,80)
Fe (mg/kg)*	0,39 (0,32; 0,63)	0,53 (0,36; 0,86)	0,233	0,44 (0,33; 0,68)
Zn (mg/kg)*	77,9 (42,7; 97,8)	67,8 (40,9; 97,9)	0,692	75,2 (42,7; 97,4)
NO ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Ba	-	-		-
Al	39 (72,2)	30 (78,9)	0,626	69 (75,0)
B	6 (11,1)	6 (15,8)	0,543	12 (13,0)
Cd	-	3 (7,9)	0,067	3 (3,3)
Li	-	-		-
Ni	2 (3,7)	5 (13,2)	0,121	7 (7,6)
Pb	22 (40,7)	17 (44,7)	0,831	39 (42,4)
Sr	26 (48,1)	17 (44,7)	0,833	43 (46,7)
V	45 (83,3)	30 (78,9)	0,598	75 (81,5)
Al (mg/kg)*	0,33 (0; 0,64)	0,33 (0,26; 8,79)	0,358	0,33 (0,06; 0,64)
B (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,569	0 (0; 0)
Ni (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,109	0 (0; 0)
Pb (mg/kg)*	0 (0; 0,04)	0 (0; 0,05)	0,481	0 (0; 0,04)
Sr (mg/kg)*	0 (0; 0,11)	0 (0; 0,09)	0,757	0 (0; 0,09)
V (mg/kg)	0,55 ± 0,40	0,40 ± 0,29	0,039	0,48 ± 0,36
MACRO				
Presencia, n (%)				
Mg	46 (85,2)	29 (76,3)	0,292	75 (81,5)
Ca (mg/kg)*	230,2 (164,3; 289,4)	225,7 (182,7; 281,3)	0,712	230,2 (176,2; 283,6)
K (mg/kg)*	760,7 (636,4; 936,1)	770,5 (643,1; 956,1)	0,877	762,4 (636,7; 940,7)
Mg (mg/kg)*	63,7 (50,2; 87,7)	65,3 (30,7; 77,5)	0,481	63,7 (42,3; 87,2)
Na (mg/kg)*	2108,1 (1970,7; 2326,3)	2020,8 (2135,2; 2282,3)	0,927	2135,2 (1972,7; 2323,9)
COMPONENTES PRINCIPALES				
C ₁ (Ca, K, Mg y Zn)	-0,07 (1,06)	-0,12 (0,89)	0,818	
C ₂ (Cu, Fe, Al y Ni)	-0,21 (0,83)	0,02 (0,94)	0,218	

C ₃ (Pb y Sr)	-0,02 (1,05)	0,13 (1,26)	0,523
C ₄ (Na)	0,14 (0,87)	-0,11 (0,96)	0,210
C ₅ (B y V)	-0,30 (0,98)	0,05 (0,63)	0,051

Los datos muestran media ± desviación típica y frecuencia (%) excepto * mediana (P₂₅; P₇₅)

Cuando el V es inferior a 0,7 produce un aumento en la tasa de fertilización con un OR de 3,06 (IC₉₅ 1,05; 8,94), y si la técnica empleada es la ICSI también produce un aumento de esta tasa con respecto a la técnica FIV con OR 13,24 (IC₉₅ 1,62; 107,87) (Fig. 3) (Tabla 5).

	B	s.e.	Sig.	Odds ratio (OR)	95% I.C. para OR	
					Inferior	Superior
(V < 0,7)	1,118	,547	,041	3,060	1,048	8,940
Técnica = ICSI	2,583	1,070	,016	13,242	1,625	107,870
Constante	-3,520	1,154	,002	,030		

Este modelo tiene un AUROC de 0,683 (IC_{95%} 0,576; 0,791; $p = 0,003$) y clasificaría de forma correcta al 64,1% de los pacientes (la tasa de fertilización es superior al 75%). En particular, de las 38 intervenciones que tuvieron mayor de 75%, hubiera indicado que 31 (81,6%), tendrían este tipo de tasa de fertilización. (Fig. 4).

Fig 3. Diagrama de cajas (box plot) del V frente a la tasa de fertilización.

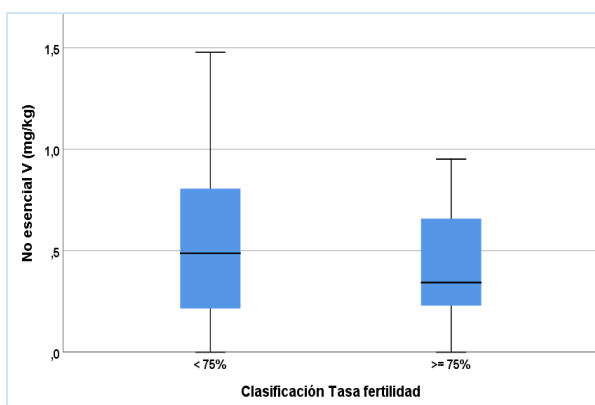
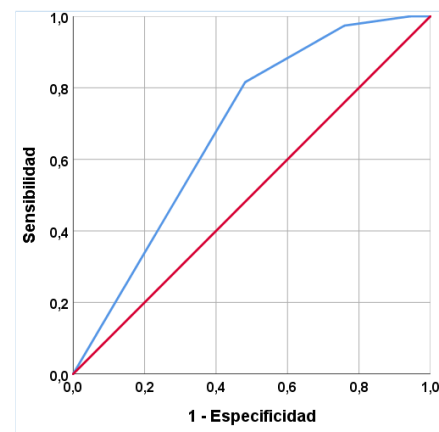


Fig 4. Curva AUROC



Si el predictor lineal, η , a partir del modelo anterior, se define como:

$$\eta = - 3,520 + 1,118 * (V < 0,7) + 2,583 * (técnica = ICSI \text{ ó } mixto)$$

Entonces, la probabilidad estimada de tener una tasa de fertilización superior al 75%, \hat{p} , sería

$$\hat{p} = \frac{e^{\eta}}{1+e^{\eta}}$$

Como se puede observar la probabilidad de tener una tasa superior al 75% es de un 54,5% cuando se realiza ICSI y el $V < 0,7$, en otros casos, no se superaría la probabilidad de un 30%. En cambio, teniendo valores de V superiores a 0,7 junto a la técnica FIV, la probabilidad estimada de tener una tasa de fertilización superior al 75% es de un 2,9% (Tabla 6).

Tabla 6. Valores estimados de obtener tasas de fertilización superiores al 75% usando el modelo de la Tabla 5		
$V < 0,7$	Técnica	\hat{p}
Sí	FIV	8,3%
Sí	ICSI	54,5%
No	FIV	2,9%
No	ICSI	28,2%

Aunque no sea significativo, destaca la tendencia que valores altos de Fe tienen hacia tasas altas de fertilización. Así, por ejemplo, el 31,6% de los que tienen una tasa de fertilización superior al 75% supera los 0,68 mg/kg frente a sólo el 20,4% en el grupo con tasa inferior al 75% ($p = 0,164$) (odds ratio 1,80 IC_{95%} 0,70; 4,67). El asterisco se corresponde con el varón nº 83. Tiene un valor de 3,4972 en Fe (el valor más alto con diferencia). Tiene seminograma patológico (Criptozoospermia), concentración patológica y movilidad patológica. El Zn también parece ser alto 120. También está en el tercer cuartil en Ca y Na; y lo supera en K y Mg. También tiene el V en el tercer cuartil (Fig. 4).

La curva ROC muestra un AUROC de 0,593 IC_{95%} 0,477; 0,710). No es significativo, pero es de los metales a parte del V que más se acercan. (Fig. 5).

Fig 4. Diagrama de cajas (box plot) del Fe frente a la tasa de fertilización.

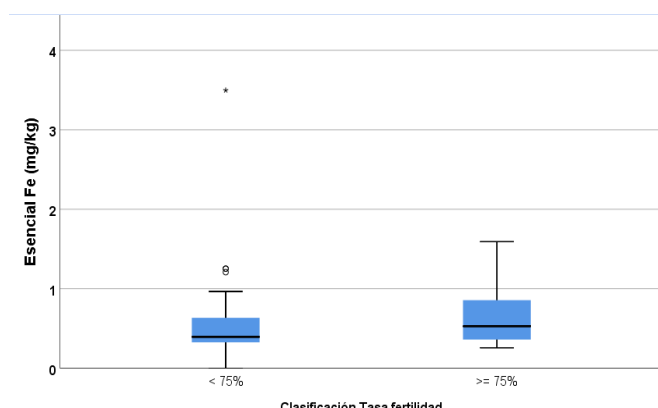
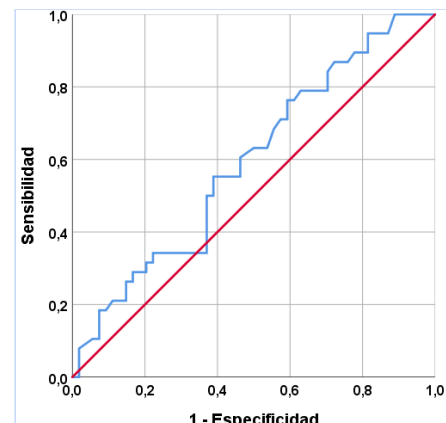


Fig 5. Curva AUROC



6.4. Tasa de división embrionaria.

La tasa de división embrionaria, cociente entre el número de ovocitos que comienzan la división frente a los maduros, es calculada sobre las 89 intervenciones en las que al menos un ovocito maduro. Esta tasa es siempre mayor al 50%, y solo 6 están por debajo de un 80%, y en general (87,6%), son del 100%. Los únicos grupos que se pueden formar son que sea de un 100% frente a que no lo sea (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de la tasa de división embrionaria				
	CLASIFICACIÓN TASA DE DIVISIÓN EMBRIONARIA			TOTAL (N = 89)
	< 100% (N = 11)	=100% (N = 78)	<i>p</i> -valor	
Mujer				
Edad	33,6 ± 4,63	35,0 ± 4,00	0,284	34,8 ± 4,08
IMC	22,9 ± 2,78	23,9 ± 3,58	0,425	23,8 ± 3,50
Hombre				
Edad	37,3 ± 7,39	38,0 ± 5,28	0,675	37,9 ± 5,54
IMC	25,5 ± 2,96	25,6 ± 3,26	0,965	25,6 ± 3,21
Seminograma			0,118	
Normal	8 (72,7)	36 (46,2)		44 (49,4)
Patológico	3 (27,3)	42 (53,8)		45 (50,6)
Concentración			0,194	
Normal	9 (81,8)	46 (59,0)		55 (61,8)
Patológico	2 (18,2)	32 (41,0)		34 (38,2)
Técnica			0,032	
FIV	4 (36,4)	7 (9,0)		11 (12,4)
ICSI y Mixto	7 (63,6)	71 (91)		78 (87,7)
METALES ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Co	-	-		-
Mo	-	-		-
Cr	-	2 (2,6)	0,767	2 (2,2)
Cu	10 (90,9)	73 (93,6)	0,558	83 (93,3)
Fe	11 (100)	76 (97,4)	0,767	87 (97,8)
Zn	11 (100)	78 (100)		89 (100)
Mn	-	-		-
Cu (mg/kg)*	0,81 (0,43; 0,94)	0,52 (0,34; 0,74)	0,105	0,53 (0,34; 0,81)
Fe (mg/kg)*	0,45 (0,30; 0,69)	0,43 (0,33; 0,72)	0,808	0,43 (0,33; 0,70)
Zn (mg/kg)*	75,2 (43,9; 99,2)	75,4 (42,3; 97,3)	0,704	75,2 (42,7; 98,3)
NO ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Ba	-	-		-
Al	7 (63,6)	59 (75,6)	0,465	66 (74,2)
B	1 (9,1)	11 (14,1)	0,649	12 (13,5)
Cd	1 (9,1)	2 (2,6)	0,330	3 (3,4)
Li	-	-		-

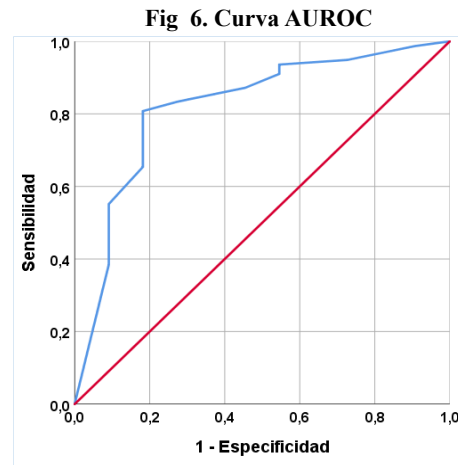
Ni	-	7 (9,0)	0,590	7 (7,9)
Pb	7 (63,6)	30 (38,5)	0,105	37 (41,6)
Sr	6 (54,5)	36 (46,2)	0,750	42 (47,2)
V	10 (90,9)	62 (79,5)	0,683	72 (80,9)
Al (mg/kg)*	0,42 (0; 0,64)	0,32 (0,18; 0,71)	0,935	0,33 (0; 0,68)
B (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,585	0 (0; 0)
Ni (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,304	0 (0; 0)
Pb (mg/kg)*	0,04 (0; 0,06)	0 (0; 0,03)	0,052	0 (0; 0,04)
Sr (mg/kg)*	0,12 (0; 0,29)	0 (0; 0,09)	0,145	0 (0; 0,09)
V (mg/kg)*	0,68 (0,47; 0,95)	0,41 (0,21; 0,69)	0,032	0,44 (0,21; 0,70)
MACRO				
Presencia, n (%)				
Mg	9 (81,8)	64 (82,1)	0,985	73 (82,0)
Ca (mg/kg)*	238,2 (164,2; 282,1)	230,2 (178,4; 285,5)	0,751	231,6 (176,2; 283,3)
K (mg/kg)*	809,9 (628,4; 1094,9)	760,7 (636,4; 944,8)	0,995	761,5 (636,0; 947,3)
Mg (mg/kg)*	69,3 (41,7; 87,7)	63,7 (42,3; 87,2)	0,861	65,5 (42,3; 87,2)
Na (mg/kg)*	2071,0 (1909,1; 2262,6)	2135,2 (1987,0; 2329,6)	0,210	2135,2 (1972,7; 2324,5)
COMPONENTES PRINCIPALES				
C ₁ (Ca, K, Mg y Zn)	-0,13 (0,91)	-0,07 (1,01)	0,859	
C ₂ (Cu, Fe, Al y Ni)	-0,35 (0,64)	-0,08 (0,92)	0,346	
C ₃ (Pb y Sr)	0,85 (1,66)	-0,07 (1,03)	0,013	
C ₄ (Na)	-0,01 (0,94)	0,05 (0,92)	0,818	
C ₅ (B y V)	-0,79 (0,87)	-0,06 (0,85)	0,010	

Los varones que no alcanzaron una tasa de división embrionaria del 100% presentan valores superiores de Pb ($p = 0,052$), además con un 63,6% con presencia frente al 38,5% en el grupo que alcanzó el 100%. Esta misma tendencia se observa sobre el V, valores superiores en el grupo que no alcanza el 100% ($p = 0,032$), presentando V el 90,9% de éstas frente al 79,5% en los que alcanzaron el 100%.

Para aquellos metales en los que se muestra una tendencia a diferenciar estos dos grupos (Cu, Pb, Sr y V) se ha realizado un estudio de punto de corte con las curvas ROC. Se ha elegido el corte en una tasa de falsos positivos del 20%, obteniendo los siguientes valores: Cu 0,82 mg/kg; Pb 0,041 mg/kg; Sr 0,092 mg/kg y V 0,718 mg/kg (nótese que estos valores prácticamente coinciden con el tercer cuartil del total de datos). Se ha utilizado Cu 0,8; Pb 0,041; Sr 0,092 y V 0,7. El modelo resultante ha sido el siguiente (Tabla 8):

	B	s.e.	Sig.	Odds ratio (OR)	95% I.C. para OR	
					Inferior	Superior
(V < 0,7)	1,906	,852	,025	6,724	1,266	35,706
(Cu < 0,8)	1,890	,779	,015	6,617	1,437	30,462
(Pb < 0,041)	1,423	,797	,074	4,149	,871	19,773
Técnica = ICSI	1,703	,827	,040	5,489	1,085	27,777
Constante	-2,625	1,336	,049	,072		

Este modelo presenta un AUROC de 0,821 (IC_{95%} 0,678; 0,963; $p = 0.001$) (Fig. 6).



Usando este modelo se tendría que si un individuo presenta todos los metales considerados (V, Cu y Pb) por encima de los niveles fijados, entonces la probabilidad de que alcanzara el 100% de tasa de división embrionaria según si no se utiliza ICSI ó si se hace, sería de un 6,7% y un 28,4% respectivamente. Si no tiene ICSI y uno de los metales está por debajo de los niveles la probabilidad se queda por debajo del 50% (aproximadamente en un 32%), aunque si fuera ICSI esta probabilidad ya pasaría a un 72%. Cuando dos metales cumplen que son inferiores y se utiliza ICSI la probabilidad es de un 94% para alcanzar el 100% en la tasa de división embrionaria.

6.5. Tasa de embriones de buena calidad

Se obtiene sobre el grupo que tuvo al menos un ovocito fertilizado, esto es, 89 intervenciones. Para la clasificación de buena calidad se ha considerado dos posibilidades, teniendo en cuenta que la mediana 50 (33,3; 66,7). Indicar que hay 12 (13,5%) de intervenciones con un 100% de buena calidad, pero que también hay 11 (12,4%) que presentan una tasa del 0%.

Se ha tomado como punto de corte el tercer cuartil, en este caso el 66,7%, así se forman los grupos ($\geq 66,7\%$ buena calidad; $< 66,7\%$ baja calidad). Para esta tasa, no sale ninguna significativa, siendo las únicas que parece estar próximas a la significación el AI ($p = 0,038$) y el resultado del seminograma ($p = 0,048$).

En el AI, dentro de los que tienen una tasa de embriones de buena calidad, inferior al 66,7% hay un 80% que presentan este mineral, bajando a un 58,3% en los que mejores tasas tienen ($p = 0,038$) (Tabla 9).

En el seminograma, se observa que en el grupo con una tasa inferior al 66,7% el porcentaje

de patológicos es del 56,9% frente a los que mejores tasas tienen donde este porcentaje es de un 33,3% ($p = 0,048$) (Tabla 9).

Tabla 9. Clasificación de la tasa de buena calidad embrionaria				
	CLASIFICACIÓN TASA DE BUENA CALIDAD			TOTAL (N = 89)
	< 66,7% (N = 65)	≥ 66,7% (N = 24)	p-valor	
Mujer				
Edad	34,8 ± 4,21	34,8 ± 3,80	0,959	34,8 ± 4,08
IMC	23,6 ± 3,46	24,2 ± 3,62	0,442	23,8 ± 3,50
Hombre				
Edad	37,9 ± 5,73	38,0 ± 5,11	0,945	37,9 ± 5,54
IMC	25,8 ± 3,34	25,1 ± 2,89	0,415	25,6 ± 3,21
Seminograma			0,048	
Normal	28 (43,1)	16 (66,7)		44 (49,4)
Patológico	37 (56,9)	8 (33,3)		45 (50,6)
Concentración			0,119	
Normal	37 (56,9)	18 (75,0)		55 (61,8)
Patológico	28 (43,1)	6 (25,0)		34 (38,2)
Técnica			0,563	
FIV	8 (12,3)	3 (12,5)		11 (12,4)
ICSI y Mixto	57 (87,7)	21 (87,5)		78 (87,7)
METALES ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Co	-	-		-
Mo	-	-		-
Cr	1 (1,5)	1 (4,2)	0,469	2 (2,2)
Cu	61 (93,8)	22 (91,7)	0,659	83 (93,3)
Fe	63 (96,9)	24 (100)	0,949	87 (97,8)
Zn	65 (100)	24 (100)		89 (100)
Mn	-	-		-
Cu (mg/kg)*	0,53 (0,34; 0,84)	0,54 (0,39; 0,72)	0,982	0,53 (0,34; 0,81)
Fe (mg/kg)*	0,45 (0,33; 0,80)	0,42 (0,33; 0,60)	0,424	0,43 (0,33; 0,70)
Zn (mg/kg)*	71,2 (40,7; 99,1)	82,4 (44,3; 96,6)	0,429	75,2 (42,7; 98,3)
NO ESENCIALES				
Presencia, n (%)				
Ba	-	-		-
Al	52 (80,0)	14 (58,3)	0,038	66 (74,2)
B	7 (10,8)	5 (20,8)	0,293	12 (13,5)
Cd	3 (4,6)	-	0,560	3 (3,4)
Li	-	-		-
Ni	7 (10,8)	-	0,183	7 (7,9)
Pb	28 (43,1)	9 (37,5)	0,809	37 (41,6)
Sr	31 (47,7)	11 (45,8)	0,876	42 (47,2)
V	50 (76,9)	22 (91,7)	0,140	72 (80,9)
Al (mg/kg)*	0,35 (0,26; 7,27)	0,27 (0; 0,41)	0,010	0,33 (0; 0,68)
B (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,193	0 (0; 0)
Ni (mg/kg)*	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,096	0 (0; 0)
Pb (mg/kg)*	0 (0; 0,04)	0 (0; 0,04)	0,710	0 (0; 0,04)
Sr (mg/kg)*	0 (0; 0,09)	0 (0; 0,10)	0,896	0 (0; 0,09)
V (mg/kg)*	0,45 (0,18; 0,74)	0,44 (0,34; 0,70)	0,242	0,44 (0,21; 0,70)

MACRO				
Presencia, n (%)				
Mg	51 (78,5)	22 (91,7)	0,217	73 (82,0)
Ca (mg/kg)*	227,4 (176,2; 281,5)	238,0 (172,5; 292,1)	0,377	231,6 (176,2; 283,3)
K (mg/kg)*	759,9 (634,6; 931,8)	855,3 (657,2; 1016,5)	0,228	761,5 (636,0; 947,3)
Mg (mg/kg)*	61,2 (41,3; 78,9)	70,4 (54,6; 87,6)	0,125	65,5 (42,3; 87,2)
Na (mg/kg)*	2135,2 (1984,7; 2315,0)	2165,8 (1966,9; 2329,8)	0,959	2135,2 (1972,7; 2324,5)
COMPONENTES PRINCIPALES				
C ₁ (Ca, K, Mg y Zn)	-0,13 (1,04)	0,06 (0,86)	0,424	
C ₂ (Cu, Fe, Al y Ni)	0,01 (0,99)	-0,43 (0,42)	0,004	
C ₃ (Pb y Sr)	0,10 (1,17)	-0,11 (1,12)	0,572	
C ₄ (Na)	0,04 (0,97)	0,05 (0,76)	0,975	
C ₅ (B y V)	-0,17 (0,78)	-0,12 (1,13)	0,826	

De todos los casos con valores altos de aluminio en la tasa $\geq 66,7\%$ solo ha quedado uno (*), También indicar que de los 7 varones a los que se les detectó , todos ellos tuvieron una tasa inferior al 66,7% (Fig. 7).

El punto de corte para el Al se tomó como 0,58 mg/kg. En particular indica que se tiene un odds ratio de 3,826 (IC_{95%} 1,015; 14,415) de tener una tasa de embriones de buena calidad superior al 66,7% si presenta aluminio $< 0,58$ mg/kg frente a los que tienen $\geq 0,58$ mg/kg. También la probabilidad de presentar una tasa alta de calidad aumenta al tener un seminograma normal, nótese que en el grupo con tasas inferior a 66,7% el porcentaje de seminograma patológico fue de un 56,9% frente al 33,3% en el grupo con tasas superior al 66,7% (Tabla 9).

	B	s.e.	Sig.	Odds Ratio (OR)	95% I.C. para OR	
					Inferior	Superior
Seminograma = Normal	,899	,513	,079	2,457	,900	6,709
Al $< 0,58$ mg/kg	1,342	,677	,047	3,826	1,015	14,415
Constante	-2,523	,686	,000	,080		

Esta es la curva ROC para este modelo. El AUROC es 0,717 (IC_{95%} 0,605; 0,828; $p = 0,002$) (Fig. 8).

Fig 7. Diagrama de cajas (box plot) del AI frente a la tasa de embriones de buena calidad

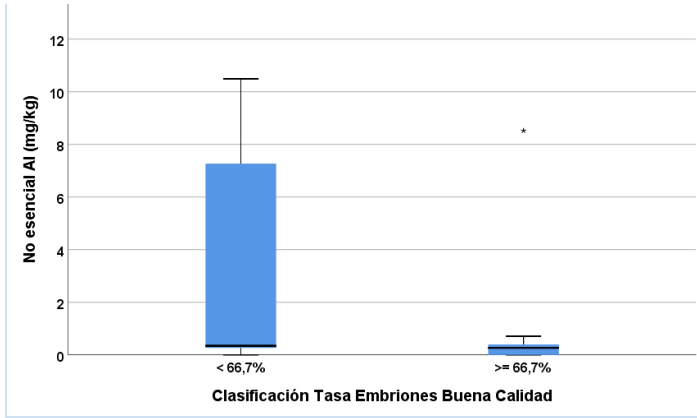
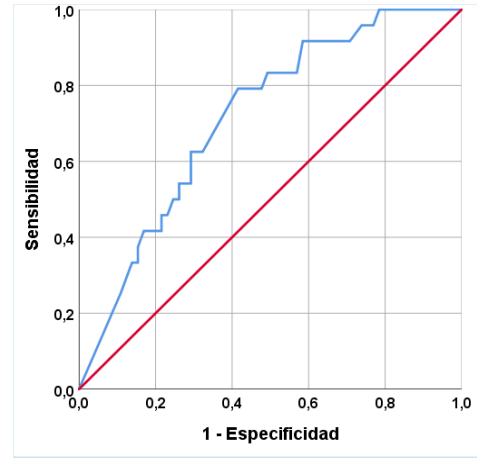


Fig 8. Curva AUROC



7. DISCUSIÓN

El análisis del líquido seminal es un procedimiento simple y no invasivo que proporciona información para establecer un diagnóstico exacto. Es el fluido corporal de elección para detectar la cantidad exacta de estos elementos, a diferencia de la sangre, que puede no estar reflejando la exposición verdadera de estos elementos a nivel del aparato reproductor masculino [7].

Hemos realizado un estudio prospectivo de carácter epidemiológico/observacional, que pretende valorar si la presencia de metales puede influir en los resultados de las TRA, así como, establecer el perfil de metales en semen con buenos resultados en las TRA.

Ovocitos

Hemos observado que el número de ovocitos obtenidos está inversamente relacionado con la edad de la mujer ($r = -0,288$, $p = 0,004$) y directamente relacionado con el IMC ($r = 0,253$, $p = 0,015$). Esto coincide con otros estudios que han demostrado que la edad es un factor de riesgo importante para la reserva ovárica, en la baja reserva ovárica la cantidad de óvulos está disminuida, y esto produce una mayor dificultad para conseguir embarazo de forma natural. [32]. La correlación positiva con el IMC parece contradictoria, pues todas las mujeres están por debajo de IMC 30, pero es debido a que este dato se controla en la consulta previo al tratamiento.

Semen

Observamos que los pacientes que residen en las islas menores, tienen una concentración mayor de V y los que toman alcohol tienen una media de V superior en semen [33].

Tasa de fertilización

Destaca que el grupo con tasas de fertilización superiores al 75% presenta valores inferiores del V, aquellos varones con valores de V superiores a 0,7 mg/kg tienen un 2,67 veces más de probabilidad de presentar una tasa de fertilización inferior al 75% que los que tienen valores inferiores a 0,7 mg/kg. El V es un metal de transición; su exposición elevada puede provocar efectos perjudiciales en los tejidos humanos, incluidos los sistemas reproductivos masculinos y femeninos. Algunos estudios en animales han demostrado que produce toxicidad en el aparato reproductor masculino mediante estrés oxidativo, y esto da lugar a la disminución del recuento y de la motilidad de espermatozoides así como una mayor concentración de espermatozoides anormales. El V es cada vez más utilizado en medicina (por ejemplo, en el tratamiento de la Diabetes Mellitus), por lo que se debe tener en cuenta sus posibles efectos

adversos en diversos órganos (intestino, riñones, hígado), además en el aparato reproductivo [34].

Destaca también el hecho de que valores altos de Fe tienen hacia tasas altas de fertilización. Así, el 31,6% de los que tienen una tasa de fertilización superior al 75% supera los 0,68 mg/kg frente a sólo el 20,4% en el grupo con tasa inferior al 75%. No hemos encontrado ninguna publicación que relacione el Fe con la tasa de fertilización.

El Zn también parece tener una relación positiva con la tasa de fertilización. Actualmente, no hay estudios sobre la relación del Zn con la tasa de fertilización, sin embargo hay varios estudios que han afirmado que el déficit del Zn puede disminuir los niveles séricos de testosterona y afectar a la espermatogénesis, y se ha demostrado también que los hombres fértiles presentan altos niveles de Zn, a diferencia de los estériles que tenían una disminución en el recuento de espermatozoides [19]. Otros autores han objetivado que la criopreservación del semen causa estrés oxidativo, daño en el ADN espermático y apoptosis de espermatozoides, sin embargo, al añadir el Zn a las muestras de semen previo a la criopreservación, se prevenía el daño del ADN espermático [18]. En estudios previos nuestros se demostró que el Zn fue mayor en los varones con espermiograma normal [Pendiente de publicación].

Tasa de división embrionaria

Hemos observado que los varones que no alcanzaron una tasa de división embrionaria del 100% tenían unos valores superiores de Pb. Estos resultados obtenidos, se asemejan a estudios previos, así como un estudio prospectivo que fue realizado en el año 2003, en el semen de las parejas de 140 mujeres que realizaban su primer ciclo de FIV, y en el que se demostró una correlación negativa entre los niveles de Pb del plasma seminal y las tasas de éxito de FIV [54]. En estudios previos demostramos que los pacientes obesos tienen un nivel de Pb inferior, y el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides fue menor en hombres obesos, aunque la baja motilidad tendrá otras causas distintas a la presencia de Pb, incluido un incremento en la tasa de fragmentación del DNA [33].

Lo mismo ocurre con el V, del que ya hemos comentado su efecto perjudicial en el aparato reproductor masculino y femenino. No se han encontrado estudios que relacionen la alta exposición del V y su influencia en las técnicas FIV/ICSI.

Tasa de embriones de buena calidad

No hemos encontrado ningún dato significativo entre los metales estudiados y la tasa de

embriones de buena calidad. Sí hemos observado respecto al Al, que una tasa de embriones de buena calidad superior al 66,7% presenta $Al < 0,58$ mg/kg. Diversos estudios recientes, citan el efecto perjudicial del Al y cómo éste produce un deterioro en la calidad del semen; afirmando que una alta concentración de Al, provocaría una disminución en la motilidad de los espermatozoides [67]. En estudios previos hemos visto que los pacientes con mucha exposición ocupacional a metales, tienen más aluminio en zonas metropolitanas e islas menores [33].

8. CONCLUSIONES

- Los varones con valores de V superiores a 0,7 mg/kg tienen mayor probabilidad de presentar una tasa de fertilización inferior al 75%.
- El Zn presenta una relación positiva con la tasa de fertilización.
- Los varones que no alcanzaron una tasa de división embrionaria del 100% tenían unos valores superiores de Pb y de V.
- Una tasa de embriones de buena calidad presenta concentraciones de Al inferiores a 0,58 mg/kg.
- Hay una tendencia a que valores altos de Fe se asocian con altas tasas de fertilización.
- Hemos podido establecer el perfil de pacientes con buenos resultados en los ciclos de TRA: Las tasas de fertilización más altas se obtienen cuando el V es inferior a 0.7 mg/Kg en semen y se utiliza la técnica ICSI.

9. ¿QUÉ HE APRENDIDO DURANTE ESTE TFG?

1. Manejo de catálogos en línea (PubMed), bases de datos, recursos de las bibliotecas e Internet con la posterior evaluación y selección de dicha información.
2. Uso de las citas y las referencias bibliográficas según normas de Vancouver.
3. La elaboración de bases de datos (Excel) que permitan el acceso a información actualizada y precisa, asegurando la disponibilidad, confidencialidad e integridad de los datos almacenados.
4. La utilización de dichas bases de datos para obtener resultados estadísticos, así como la interpretación de estos de forma adecuada.
5. He ampliado mis conocimientos sobre la esterilidad, diagnóstico de esterilidad, las TRA, indicaciones del espermograma y estudio de metales en semen.
6. Ha servido como un primer contacto con la actividad investigadora básica en la Medicina.
7. Trabajo en equipo.

10. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, la Dra. Rubí Nieves Rodríguez Díaz por el desarrollo del presente trabajo, su dedicación y por solucionar todas las dudas.

A la Dra. Raquel Blanes Zamora por la recogida de datos de las TRA, por su trabajo en el laboratorio de FIV así como la colaboración en este TFG, y a los miembros de la URH del HUC.

Al Área de Toxicología de la ULL, en especial al Dr. Arturo Hardisson, por la determinación de los metales.

Al Prof. Enrique Francisco González Dávila, por su tiempo y la realización del análisis estadístico de los datos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. WHO | Infertility definitions and terminology. Human Reproduction Programme. 2016.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Steven G. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;9(12):e1001356. doi: [10.1371/journal.pmed.1001356](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356)
3. Dobrakowski M, Kaletka Z, Machoń-Grecka A, Kasperczyk S, Horak S, Birkner E, Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk A. The role of oxidative stress, selected metals, and parameters of the immune system in male fertility. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–14. doi: [10.1155/2018/6249536](https://doi.org/10.1155/2018/6249536)
4. Hajjar T, Soleymani F, Vatanchian M. Protective Effect of Vitamin C and Zinc as an Antioxidant Against Chemotherapy-Induced Male Reproductive Toxicity. *J Med Life*. 2020;13(2):138–43. doi: [10.25122/jml-2019-0107](https://doi.org/10.25122/jml-2019-0107)
5. Milostić-Srb A, Včev A, Tandara M, Marić S, Kuić-Vadlja V, Srb N, et al. Importance of Zinc Concentration in Seminal Fluid of Men Diagnosed With Infertility. *Acta Clin Croat*. 2020;59(1):154–60. doi: [10.20471/acc.2020.59.01.19](https://doi.org/10.20471/acc.2020.59.01.19)
6. Xu W, Bao H, Liu F, Liu L, Zhu YG, She J, et al. Environmental exposure to arsenic may reduce human semen quality: Associations derived from a Chinese cross-sectional study. *Environ Health* 2012;11 (1):1–15. doi: [10.1186/1476-069X-11-46](https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-46)
7. Sukhn C, Awwad J, Ghantous A, Zaatari G. Associations of semen quality with non-essential heavy metals in blood and seminal fluid: data from the Environment and Male Infertility (EMI) study in Lebanon. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(9):1691–701. doi: [10.1007/s10815-018-1236-z](https://doi.org/10.1007/s10815-018-1236-z)
8. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*. 2003; Dec 1: 167-82. doi: [10.1093/bmb/ldg032](https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032)
9. Natividad Rodríguez Expósito, bajo la dirección de José Gutiérrez Fernández, Arturo Hardisson La Torre CRA. Metales en *Pangasius Hypophthalmus*. Evaluación nutricional y toxicología. 2015 [cited 2018 Feb 6]. <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=78597>
10. Arnich N, Sirot V, Rivière G, Jean J, Noël L, Guérin T, Leblanc J. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. *Food Chem Toxicol*. 2012 Jul ;50(7):2432–49. doi: [10.1016/j.fct.2012.04.016](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.016)
11. Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The effects of cadmium toxicity. Vol. 17, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG. 2020; May 26;17(11):3782. doi: [10.3390/ijerph17113782](https://doi.org/10.3390/ijerph17113782)

12. Wu HM, Lin-Tan DT, Wang ML, Huang HY, Wang HS, Soong YK, et al. Cadmium level in seminal plasma may affect the pregnancy rate for patients undergoing infertility evaluation and treatment. *Reprod Toxicol*. 2008;25(4):481–4. doi: [10.1016/j.reprotox.2008.04.005](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.04.005)
13. Kasperczyk A, Dobrakowski M, Horak S, Zalejska-Fiolka J, Birkner E. The influence of macro and trace elements on sperm quality. *J Trace Elem Med Biol*. 2015 Apr 1 ;30:153–9; doi: [10.1016/j.jtemb.2014.12.007](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.12.007)
14. Hashemi MM, Behnampour N, Nejabat M, Tabandeh A, Ghazi-Moghaddam B, Joshaghani HR. Impact of Seminal Plasma Trace Elements on Human Sperm Motility Parameters. *Rom J Intern Med* 2018 Mar;56(1):15–20. doi: [10.1515/rjim-2017-0034](https://doi.org/10.1515/rjim-2017-0034)
15. Bolanca I, Obhodas J, Ljiljak D, Matjacic L, Kuna K. Synergetic Effects of K, Ca, Cu and Zn in human semen in relation to parameters indicative of spontaneous hyperactivation of spermatozoa. *PLoS One*. 2016;11(3):1–19. doi: [10.1371/journal.pone.0152445](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152445)
16. Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: Correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Mol Med*. 2009; 15(7–8):248–62. doi: [10.2119/molmed.2008.00104](https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00104)
17. Kasperczyk A, Dobrakowski M, Czuba ZP, Kapka-Skrzypczak L, Kasperczyk S. Environmental exposure to zinc and copper influences sperm quality in fertile males. *Ann Agric Environ Med*. 2016;23(1):138–43. doi: [10.5604/12321966.1196869](https://doi.org/10.5604/12321966.1196869).
18. Giacone F, Condorelli RA, Mongioi LM, Bullara V, La Vignera S, Calogero AE. In vitro effects of zinc, D-aspartic acid, and coenzyme-Q10 on sperm function. *Endocrine*. 2017;56(2):408–15. doi: [10.1007/s12020-016-1013-7](https://doi.org/10.1007/s12020-016-1013-7)
19. Kotdawala AP, Kumar S, Salian SR, Thankachan P, Govindraj K, Kumar P, et al. Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(12):1447–53. doi: [10.1007/s10815-012-9894-8](https://doi.org/10.1007/s10815-012-9894-8)
20. Schisterman EF, Sjaarda LA, Clemons T, Carrell DT, Perkins NJ, Johnstone E, et al. Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(1):35–48. doi: [10.1001/jama.2019.18714](https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714)
21. Ahmadi R, Faraji N. In vitro Effects of lithium on Human Sperm Motility. *Int Conf Soc Sci Med Nurs*. June 5-6, 2015; doi: [10.15242/IICBE.C0615095](https://doi.org/10.15242/IICBE.C0615095)
22. World Health Organization. WHO laboratory manual for test Examination and processing of human semen. Fifth Edit. 2010. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241547789>
23. Eskew AM, Jungheim ES. A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. *Mo Med*. 2017; 114(3):156–9. PMID: [PMC6140213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/276140213/)

24. Bloom MS, Parsons PJ, Kim D, Steuerwald AJ, Vaccari S, Cheng G, et al. Toxic trace metals and embryo quality indicators during in vitro fertilization (IVF). *Reprod Toxicol.* 2011 Feb;31(2):164–70. doi: [10.1016/j.reprotox.2010.11.011](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.11.011)
25. Kumar S, Sharma A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. Vol. 34, *Reviews on Environmental Health.* 2019 Dec 18;34(4):327-338. doi: [10.1515/reveh-2019-0016](https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016)
26. Schisterman EF, Sjaarda LA, Clemons T, Carrell DT, Perkins NJ, Johnstone E, et al. Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2020;323(1):35–48. doi: [10.1001/jama.2019.18714](https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714)
27. Benoff S, Centola GM, Millan C, Napolitano B, Marmar JL, Hurley IR. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum Reprod.* 2003 Feb 1;18(2):374–83. doi: [10.1093/humrep/deg020](https://doi.org/10.1093/humrep/deg020)
28. Yıldırım E, Derici MK, Demir E, Apaydın H, Koçak Ö, Kan Ö, et al. Is the Concentration of Cadmium, Lead, Mercury, and Selenium Related to Preterm Birth?. *Biol Trace Elem Res.* 2019 Oct 15; 191(2):306–12. doi: [10.1007/s12011-018-1625-2](https://doi.org/10.1007/s12011-018-1625-2)
29. Genchi G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. Nickel: Human health and environmental toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* MDPI AG. 2020; Vol. 17. doi: [10.3390/ijerph17030679](https://doi.org/10.3390/ijerph17030679)
30. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (1995) *Pure Appl Chem* 67: 1699–1723. <http://publications.iupac.org/pac/67/10/1699/index.html>
31. M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta, Jorge Cuadros Fernández. 6^o Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3^o. 2015. <https://www.dropbox.com/s/boj55wewi7drugw/60>
32. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* Mosby Inc. 2017; Vol. 217: 129–40; doi: [10.1016/j.ajog.2017.02.027](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.02.027)
33. Rodríguez-Díaz R, Alcaide-Ruggiero L, Rodríguez-Fiestas S, Hess-Medler S, González-Pérez J, Gutiérrez ÁJ, et al. Associations of Semen Quality with Seminal Non-essential Heavy Metals in Males from the Canary Islands. *Biol Trace Elem Res.* 2021. doi: [10.1007/s12011-021-02605-5](https://doi.org/10.1007/s12011-021-02605-5)
34. Wang YX, Chen HG, Li XD, Chen YJ, Liu C, Feng W, et al. Concentrations of vanadium in urine and seminal plasma in relation to semen quality parameters, spermatozoa DNA damage and serum hormone levels. *Sci Total Environ.* 2018 Dec 15;645:441–8; doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.07.137](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.137)