



This book is provided in digital form with the permission of the rightsholder as part of a Google project to make the world's books discoverable online.

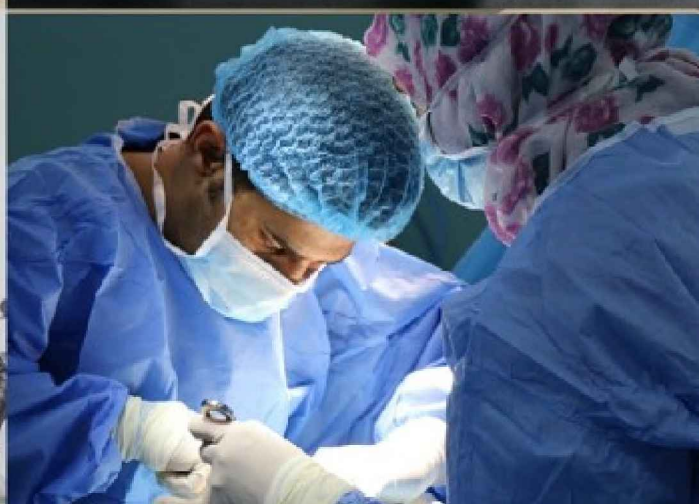
The rightsholder has graciously given you the freedom to download all pages of this book. No additional commercial or other uses have been granted.

Please note that all copyrights remain reserved.

### **About Google Books**

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Books helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>

# Salud Reproductiva Masculina



**Editores:** Biol. Gerardo Cerezo Parra  
Dra. Rocío Núñez Calonge  
Dra. Mónica Vazquez-Levin

**Año 2023**

# SALUD REPRODUCTIVA MASCULINA

**Gerardo Cerezo Parra, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin**

Copyright © 2023 Gerardo Cerezo Parra, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin

ISBN: 978-607-99997-1-1

Todos los derechos reservados.

Diseño de portada: Melisa Dana Levin.

Registro editorial: Yao Díaz.

Editado en Ciudad de México, México.

Cómo citar este libro:

Cerezo Parra Gerardo, Rocío Núñez Calonge y Mónica Vazquez-Levin, eds. 2023. Salud Reproductiva Masculina. México: Yao Díaz, 2023.

Este material puede compartirse sin autorización previa de los editores. Se debe dar crédito de manera adecuada e indicar si se han realizado cambios. Queda prohibido hacer uso del material con propósitos comerciales.

# CONTENTS

Title Page

Copyright

Editores

Autores

Introducción

Evaluación clínica de la infertilidad masculina

Fisiología del espermatozoide humano

Introducción a la espermatología

El análisis básico del semen

Actualización 2021 sobre el examen básico del semen por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y

El valor de la morfología del espermatozoide en la práctica clínica

Análisis de células redondas y semen:  
importancia y determinación

Origen de la fragmentación del ADN espermático: Papel de la apoptosis, la inmadurez y el estrés oxid

Fragmentación del ADN espermático.

Fundamentos y metodología diagnóstica disponible para el laboratorio

Impacto de las infecciones en la fertilidad masculina

La importancia y las aplicaciones del análisis espermático asistido por computadora (CASA) en el laboratorio

Técnicas citogenéticas aplicadas  
al estudio de la infertilidad masculina

Banco de semen humano en Canadá

Técnicas de procesamiento del semen para inseminación

Técnicas de micromanipulación espermática en el laboratorio de reproducción asistida

Vitrificación de espermatozoides humanos: efecto de crioprotectores y métodos de enfriamiento en la

Criopreservación de

Microrrobótica para el movimiento de espermatozoides controlado en forma remota

Varicocele: más allá de un trastorno vascular

Azoospermia: causas y tratamiento

Perspectiva actual del uso clínico de los antioxidantes para el tratamiento de la infertilidad masculina

Andrología reproductiva del varón adolescente

Anticoncepción hormonal masculina: una realidad

Andropausia

Efectos tóxicos de la exposición a metales y plaguicidas sobre los espermatozoides y su repercusión

Impacto de la edad y los factores clínicos y socioambientales sobre la calidad del semen

Disminución de la calidad del semen en los últimos 30 años

Estudios globales en Andrología: de la investigación al laboratorio clínico

La Andrología en la era de las técnicas de reproducción asistida:

La Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (MRHI). Historia y misión

## EDITORES



### **Biol. Gerardo Cerezo Parra**

- Licenciado en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Entrenamiento en el Laboratorio de Criopreservación y Banco de semen de las empresas: REPROMED LIMITED y AVR ANDROLOGY INC. 2003. Toronto, Canadá.
- Certificado en Análisis de Semen por el *Special Interest Group in Andrology* (SIGA) de la *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE). Oporto, Portugal. 2007.
- Director general del Banco de Espermatozoides y Laboratorio de Andrología LÁFER y FERTIMÉXICO. 2008 a la fecha.
- Profesor de más de 150 cursos de análisis del semen humano de 2005 a la fecha.
- Inscrito al Programa de Aseguramiento de la Calidad Externa de Andrología de la *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE).2004-2006.
- Editor del *Manual para el Análisis Básico de Semen: Una Guía Práctica*. 2014.
- Editor del *Manual para el Análisis del Semen Humano: Una Guía Práctica*. 2022.
- Miembro Fundador del Programa Latinoamericano para la Estandarización del Análisis Seminal (PLEAS). Presidente 2022-2024.
- Miembro del *Global Andrology Forum* (GAF) 2022-actual.
- Miembro de la Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción A.C. (AMMR).

Correo electrónico: [gcerezop@gmail.com](mailto:gcerezop@gmail.com)



**Dra. Rocío Núñez Calonge, Ph.D.**

- Doctora en Biología por la Universidad Complutense de Madrid.
- Especialista en reproducción humana desde el año 1985, cuando comenzó en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid.
- Formación post-doctoral en *Center for Research on Reproduction and Women's Health (Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania Medical Center) de Filadelfia, USA.*
- Título de Embrióloga senior de la Sociedad Europea de Fertilidad y Reproducción Humana (ESHRE).
- Ha pertenecido a la junta directiva de diversas sociedades científicas (SEF, ASES, ASEBIR) y es miembro del comité editorial de varias revistas científicas.
- Codirectora de la Revista Iberoamericana de Fertilidad.
- Desde 2005 a 2017, subdirectora de la Clínica Tambre, responsable de Calidad, secretaria de la Fundación Tambre y fundadora del Comité de Ética.
- Máster en Bioética.
- Profesora de los siguientes másteres en reproducción: Universidad Complutense, Universidad de Barcelona, Universidad de Miguel Hernández, Universidad de Alicante, Universidad de Badajoz, Universidad Lusófona y Universidad de Almería.
- Profesora en el título de Especialización en Bioética Clínica de la Universidad Complutense de Madrid.
- Patrono de la Fundación IERA (Instituto extremeño de reproducción asistida).
- Actualmente, Coordinadora científica y Responsable de Calidad en Grupo Internacional de Reproducción (URA).



Correo electrónico: [rocioncalonge@gmail.com](mailto:rocioncalonge@gmail.com)



**Dra. Mónica H. Vazquez-Levin, Ph.D.**

- Doctora en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.
- Especialista en Gestión de Tecnología e Innovación de la Universidad de Tres de Febrero.
- Miembro del *HRP Research Project Review Panel* (RP2) de la Organización Mundial de la Salud.
- Miembro de *Male Reproductive Health Initiative* (MRHI).
- Miembro de *Core Outcome Measures for Male Infertility Trials* (COMMIT).
- Miembro del *Experts Group on Inositol in Basic and Clinical Research* (EGOI).
- Editora de las Revistas Científicas Internacionales *Fertility and Sterility*, *Fertility and Sterility Science*, *Frontiers in Endocrinology* (Área Reproducción), *Human Reproduction* (Editora Asociada).
- Editora de *Social Media* de la *International Society of Andrology* (ISA).
- Fundadora y Coordinadora Red AndroLATAM, asociada a RedLARA.
- Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).
- Directora Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET)– Fundación IBYME (FIBYME). Buenos Aires, Argentina.
- Coordinadora de Plataforma de Servicios Especializados BIMOVA (Biomarcadores, Modelos y Validaciones).
- Especialista en Andrología (Sociedad Argentina de Andrología).
- Profesora en el Máster de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

Correo electrónico: [mhvazl@gmail.com](mailto:mhvazl@gmail.com)

## AUTORES

orden alfabético



**Dr. R. John Aitken**

Centro Prioritario de Investigación en Ciencias de la Reproducción, Disciplina de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Ambientales y de la Vida, Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Medio Ambiente, Universidad de Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia, Instituto de Investigación Médica Hunter, New Lambton Heights, NSW, 2305, Australia, Newcastle, Australia.



**Dr. Antonio Alcaraz Asensio**

Jefe de Servicio de Urología, Catedrático de Urología. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.



**Dr. Conrado Avendaño**

Director del Departamento de Investigación y Desarrollo Neolife, Cirugía y Medicina Reproductiva de Asunción, Paraguay, Secretario Comisión Directiva Sociedad Argentina de Andrología (2022-2023).



**Prof. Dr. Elisabetta Baldi**

Departamento de Medicina Experimental y Clínica, Universidad de Florencia, Florencia, Italia.



**Dr. Maajid Hassan Bhat, Ph.D.**

Banco Tejidos Reproductivos y Andrología, ReproMed Ltd, Ontario, Canadá.



**Dr. Lars Björndahl, M.D., Ph.D.**

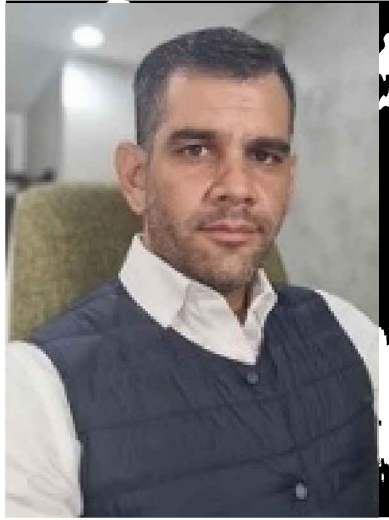
Director del Laboratorio de Andrología ANOVA – Hospital Universitario Karolinska y Departamento de Medicina, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.



**Dr. Waleed Z Butt**

Fellow de Endocrinología, Harbor-UCLA, Los Ángeles, California, Estados Unidos.





**Dr. Saulo Amando Camarena Romero**

Urólogo – Andrólogo, Director de Andromex, Profesor y Secretario de Academia de Urología de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.



**Dr. Pedro Caballero Peregrín, M.D.**

Especialista en Obstetricia y Ginecología, Fundación IERA, Madrid, España.



**Dra. Jéssica Calvo**

Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa, Cátedra de Biomedicina Reproductiva Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España.



**Lic. Débora Catalano**

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), Fundación IBYME (FIBYME), Buenos Aires, Argentina.



**Biol. Gerardo Cerezo Parra**

Director general del Banco de Espermatozoides y Laboratorio de Andrología, LÁFER y FERTIMÉXICO, Miembro Fundador del Programa Latinoamericano para la Estandarización del Análisis Seminal (PLEAS). Presidente 2022-2024, Miembro del *Global Andrology Forum* (GAF) 2022-actual, Ciudad de México, México.



**Lic. Juliana Cicaré**

Embrióloga clínica de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva y de la Sociedad Argentina de Embriología Clínica, Servicio de Medicina Reproductiva, Instituto Gamma, Rosario, Argentina, Rosario, Argentina.



**Dr. Juan Manuel Corral Molina, M.D., Ph.D., FEBU**

Especialista Senior, Servicio de Urología y Trasplante Renal (ICNU), Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, España.



**Dr. Stuart Dawe-Long**

Fideicomiso de la Fundación NHS de la Universidad de Manchester, Manchester, Reino Unido.





**Dr. Christopher De Jonge, Ph.D., HCLD (ABB)**

Director, Programa de Andrología, Centro Médico de la Universidad de Minnesota, Profesor Adjunto Departamento de Urología, Universidad de Minnesota, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos.



**Dr. Alfonso P. Del Valle, M.D., FRCS(C)**

Presidente y Director Médico, Instituto de Medicina Reproductiva de Toronto, ReproMed Ltd, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Universidad de Toronto, Ontario, Canadá, Banco Tejidos Reproductivos y Andrología, ReproMed Ltd., Ontario, Canadá.



**Dr. Steven Fleming**

Director de Embriología, Cooper Surgical Fertility Solutions, Málov, Dinamarca.



**Dr. Ferran García**

Presidente de la Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA),  
Barcelona, España.



**MCs. Sergio Arturo González Ortiz**

Coordinación de Investigación, Centro de Alta Especialidad “Dr. Rafael Lucio”, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana (UV), Xalapa, México.



**Dr. Evgenia Isachenko**

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.



**Dr. Vladimir Isachenko**

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.



**Meritzell Jodar, Ph.D.**

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, CDB, Hospital Clínic de Barcelona, Grupo de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Unidad de Genética, Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.





**Dr. Thinus Frans Kruger**

Centro de Fertilidad Aevitas, Hospital Vincent Pallotti, Pinelands, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.



**Dr. Pradeep Kumar**

Instituto Central de Investigación sobre Búfalos (ICAR), India.



**IB Aylin Larrañaga Parrado**

Laboratorio de Reproducción masculina y Epigenética Ambiental, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México.



**Dra. Marina Leiva**

Estudiante de doctorado en Grupo de Biología Molecular y del Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer, Barcelona, España.



**Dr. Hae Seung Lee**

Instituto Lundquist, Centro médico de la UCLA, Torrance, California, Estados Unidos.



**M.C. Luna María López Pérez**

Estudiante de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Veracruzana (UV), Campus Veracruz, Analista del Laboratorio y Banco de Espermatozoides LÁFER, Profesora de cursos de análisis del semen, Veracruz, Veracruz, México.



**Dr. Ricardo Lozano, Ph.D.**

Profesor de Bioquímica de la Universidad de Maimónides, Director Programa Latinoamericano de la Estandarización del Análisis Seminal, Mérida, Venezuela.



**Dr. rer. nat. Veronika Magdanz**

Grupo Smart Nanobiodevices, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona, España.





**Dr. Peter Mallmann**

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.



**Dra. Dolors Manau Trullas, M.D., Ph.D.**

Jefe de Sección de la Unidad de Reproducción Humana, Departamento de Ginecología y Obstetricia. ICGON, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España.



**Lic. Ania Antonella Manjon**

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), Fundación IBYME (FIBYME), Buenos Aires, Argentina.



**Dra. Liana Maree, Ph.D.**

Laboratorio de espermatología comparada, Departamento de Biociencia Médica, Universidad del Cabo Occidental, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.



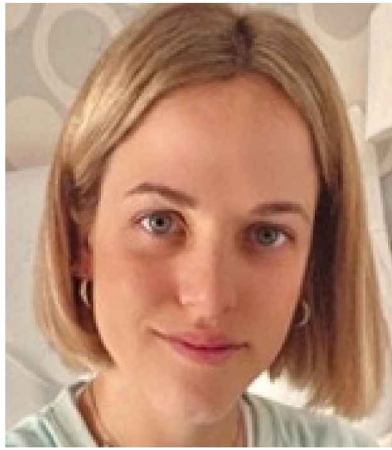
**Dr. Sara Marchiani**

Departamento de Ciencias Biomédicas, Experimentales y Clínicas "Mario Serio", Universidad de Florencia, Florencia, Italia.



**Dr. Marcelo Marconi Toro**

Urólogo-Andrólogo, Profesor Asistente Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Urología Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.



**Lic. Camila Mariatti**

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET)- Fundación IBYME (FIBYME), Buenos Aires, Argentina.



**B. José Manuel Mayorga Torres, doctorando**

Grupo de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Unidad de Genética, Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.





**Bqca. Rosa Molina**

Directora LAR, Laboratorio de Andrología y Reproducción, Córdoba, Argentina.



**Dr. David Morroll**

Cooper Surgical Fertility Solutions, Málov, Dinamarca.



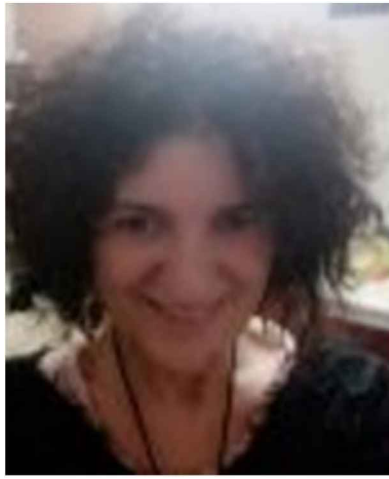
**Dra. María José Munuce**

Bioquímica, Doctora en Ciencias Biomédicas, Especialista de Andrología de la Sociedad Argentina de Andrología (SAA).

Docente e investigadora, Laboratorio de Medicina Reproductiva, Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Directora de Reprolab Sanatorio Británico de Rosario y del Laboratorio de Andrología del Servicio de Medicina Reproductiva, Instituto Gamma, Rosario, Argentina.

Presidente de la Sociedad Argentina de Andrología (SAA 2022-2023), Rosario, Argentina.



**Dra. Monica Muratori**

Departamento de Ciencias Biomédicas, Experimentales y Clínicas "Mario Serio", Universidad de Florencia, Florencia, Italia.



**Dra. Rocío Núñez Calonge, Ph.D.**

Directora Científica en Grupo UR Internacional, Profesora en el Máster de Reproducción de la Universidad Complutense y Sociedad Española de Fertilidad, Coeditora Científica y Codirectora de la Revista Iberoamericana de Fertilidad, Barcelona, España.



**Dra. Isabel Ochando**

Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa, Departamento de Histología y Anatomía, Universidad Miguel Hernández, Cátedra de Biomedicina Reproductiva Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España.



**Dr. Rafael Oliva, M.D., Ph.D.**

Grupo de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Unidad de Genética, Departamento de Biomedicina, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España.



**Dr. Gerardo Eusebio Ortiz Lara**

Urólogo–Andrólogo, Profesor Clínico en Tecnológico de Monterrey, Hospital Zambrano Hellion TecSalud, San Pedro Garza García, Nuevo León, México. Servicio de Urología del Centro Médico ABC, Ciudad de México, México.





**Dr. Pedro Cuapio Padilla**

Andrólogo–Embriólogo, Responsable del Laboratorio de Andrología, HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español, Ciudad de México, México.



**Dr. Cristian Palma Ceppi**

Profesor Asociado Universidad de Chile, Departamento de Urología Clínica Las Condes, Unidad de Medicina Reproductiva Clínica Las Condes, Departamento de Urología Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile.



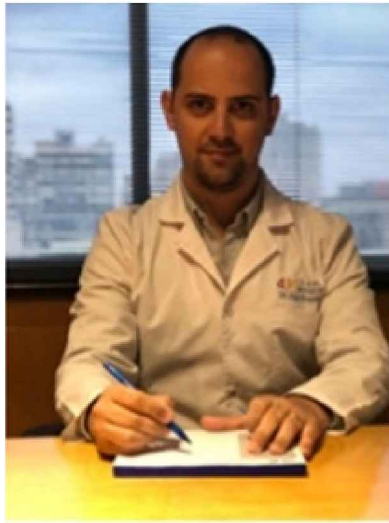
**Dra. María Betzabet Quintanilla Vega**

Laboratorio de Reproducción masculina y Epigenética Ambiental, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México.



**Dra. Gohar Rahimi**

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.



**Dr. Alejo Rasguido**

Médico Urólogo–Andrólogo, Staff Urología de Centro Urológico Dr. Rasguido, Staff Andrología de Fertilía Medicina Reproductiva, Tucumán, Argentina.



**Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna, Ph.D.**

Doctora en Ciencias con Especialidad en Biología de la Reproducción, Profesor Investigador. Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México.



**Dr. Gastón Rey Valzacchi**

Director Médico de Procreate, Jefe Sección Andrología y Reproducción, Servicio Urología Hospital Italiano, Profesor Instituto Universitario Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina.



**Biol. Hugo Manuel Rodríguez Hernández**

Responsable del Laboratorio de embriología, Centro de Ginecología, Genética y Reproducción Asistida "CGYRA", Hospital del Pacífico. Profesor de cursos de laboratorio de andrología y embriología, Acapulco, Guerrero, México.





**QFB Eduardo Rojas Prado, doctorando**

Laboratorio de Reproducción masculina y Epigenética Ambiental, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México.



**Dr. Joaquín Rueda**

Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa, Departamento de Histología y Anatomía, Universidad Miguel Hernández, Cátedra de Biomedicina Reproductiva Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España.



**Dr. Carlos Gerardo Salazar López Ortiz**

Director Médico Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español HISPAREP, Ciudad de México, México.



**Dr. José Carlos Salazar Trujillo**

Médico Asociado Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español HISPAREP, Ciudad de México, México.



**Dra. Rossana Sapiro**

Profesor Agregado Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.



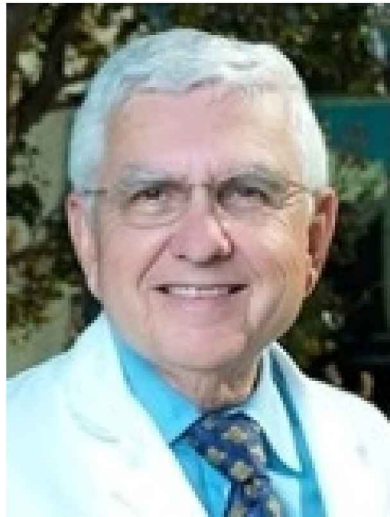
**Dr. Luis Sarabia Villar**

Programa de Biología Integrativa, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.



**MCs. María de Jesús Solís Heredia**

Laboratorio de Reproducción masculina y Epigenética Ambiental, Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ciudad de México, México.



**Dr. Ronald Swerdloff**

Investigador Principal, Instituto Lundquist, Profesor distinguido de medicina, Escuela de Medicina David Geffen de UCLA, Jefe de la División de Endocrinología, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, California, Estados Unidos.





**Dr. Lara Tamburrino**

Departamento de Medicina Experimental y Clínica, Universidad de Florencia, Florencia, Italia.



**Dr. Antonio Urbano**

Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa, Departamento de Histología y Anatomía, Universidad Miguel Hernández, Cátedra de Biomedicina Reproductiva Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España.



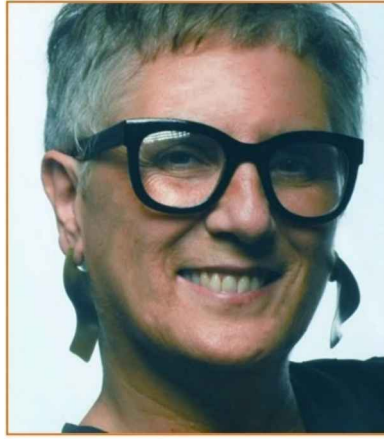
**Dr. Gerhard van der Horst, Ph.D., Ph.D.**

Laboratorio de espermatología comparada, Departamento de Biociencia Médica, Universidad del Cabo Occidental, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.



**Dr. Fernando Vásquez Rengifo**

Médico Andrólogo, Director Maestría en Salud Sexual y Reproductiva, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.



**Dra. Mónica H. Vazquez-Levin, Ph.D.**

Directora Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET)– Fundación IBYME (FIBYME), Coordinadora de Plataforma de Servicios Especializados BIMOVA (Biomarcadores, Modelos y Validaciones), Buenos Aires, Argentina.



**Dra. Judith Velasco Carrillo, Ph.D.**

Laboratorio de síndromes gastrointestinales y urinarios "Prof. Luisa Vizcaya", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.



**Dr. Gustavo Luis Verón**

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) – Fundación IBYME (FIBYME), Buenos Aires, Argentina.



**Dr. Georgios Voulgaridis**

Presidente de la Asociación Helénica de Espermatología, Atenas, Grecia.





**Dra. Christina Wang, M.D.**

Director Asociado Instituto de Ciencias Clínicas y Traslacionales, Instituto Lundquist, Profesor de Medicina, Facultad de Medicina David Geffen de UCLA, División de Endocrinología, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, California, Estados Unidos.



**Dra. Mengying Wang**

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.

# INTRODUCCIÓN

Gerardo Cerezo Parra  
Rocío Núñez Calonge  
Mónica Vazquez-Levin

**Salud Reproductiva Masculina** refiere al estudio del sistema reproductivo masculino, incluyendo la función sexual y el potencial fértil, y puede verse influenciada por una variedad de factores, que incluyen la genética, los hábitos de estilo de vida, las exposiciones ambientales y ocupacionales, así como la edad. La infertilidad y las infecciones de transmisión sexual, así como la andropausia afectan la salud reproductiva masculina. Además, datos recientes indican que los hombres infértiles tienen un mayor riesgo de trastornos somáticos, como el cáncer, y mueren más jóvenes en comparación con hombres fértiles. Asimismo, varios estudios destacan un efecto adverso significativo de la infertilidad masculina en la salud de la descendencia. Otro aspecto importante en la salud reproductiva masculina es la anticoncepción.

La evaluación de la salud reproductiva masculina involucra el examen físico y la historia clínica, pruebas de laboratorio y estudios de imágenes del paciente. Las pruebas de laboratorio incluyen la evaluación del semen, desde características básicas de los espermatozoides, estudios bioquímicos de marcadores del plasma seminal y análisis de otros tipos celulares, así como la detección de anticuerpos antiespermáticos, infecciones bacterianas y virales. Las tecnologías actuales incluyen en algunos casos, la evaluación del núcleo espermático y parámetros cinemáticos del espermatozoide. De igual forma, en asociación con los resultados de la evaluación clínica y de laboratorio, se realizan ensayos de diagnóstico genético y molecular. En el futuro, estos estudios se incrementarán con la incorporación de herramientas de análisis global al diagnóstico y seguimiento de los tratamientos, de manera similar a los abordajes utilizados en otras patologías. La infertilidad masculina puede ser tratada con procedimientos orientados a la restitución de las funciones del aparato reproductor, así como la aplicación de diversos métodos para la selección espermática, procedimientos de reproducción médica asistida de baja o alta complejidad y otros asociados, como la criopreservación y vitrificación espermática. Se encuentran en desarrollo tecnologías que no solo se centran en mejorar la *performance* del gameto masculino, sino además su uso alternativo, por ejemplo, como transportador de drogas.

Mantener una salud reproductiva masculina adecuada es importante para el bienestar general y específicamente para la función sexual y reproductiva. Los chequeos regulares, las opciones de estilo de vida saludables y las prácticas sexuales seguras son importantes para promover una salud reproductiva masculina óptima a lo largo de la vida. Abordar cualquier problema relacionado con la función sexual, la fertilidad u otros problemas puede ayudar a identificar y abordar los problemas de salud subyacentes y promover una calidad de vida óptimas.

El libro electrónico **Salud Reproductiva Masculina**, editado por los **Dres. G. Cerezo Parra, R. Núñez Calonge y M. Vazquez-Levin**, es el resultado de los generosos aportes de expertas y expertos andrólogos de habla hispana, así como de referentes internacionales que enviaron sus capítulos en inglés y fueron traducidos por los editores para compendiar toda la información en idioma castellano. El libro comprende un total de 30 capítulos con los aportes de 73 autores. Las temáticas abarcan aspectos importantes de la salud reproductiva masculina, desde aspectos relevantes al diagnóstico y tratamiento actual de la infertilidad masculina, temáticas de anticoncepción hormonal y la andropausia hasta temas innovadores como el concepto del uso de los espermatozoides como micro-robots.

En relación a la infertilidad masculina, el libro incluye varios capítulos que abordan aspectos clínicos: **“Evaluación clínica de la infertilidad masculina”**, a cargo de los Dres. C.G. Salazar López Ortiz, P. Cuapio Padilla y J.C. Salazar Trujillo; **“Andrología reproductiva del varón adolescente”**, por el Dr. F. Vásquez Rengifo; **“Varicocele: Más allá de un trastorno vascular”**, a cargo de los Dres. R. Lozano Hernández y A. Rasguido y **“La Azoospermia: Causas y tratamientos”**, por el Dr. G. Rey Valzacchi.

El libro además compendia capítulos relacionados al espermatozoide y estudios de laboratorio para el análisis del semen. En particular, incluye un capítulo a cargo de los Dres. R. Reyes Luna, H.M. Rodríguez Hernández y G. Cerezo Parra titulado **“Fisiología del espermatozoide humano”** y otro a cargo del Dr. G. Voulgaridis sobre **“Introducción a la espermatoología”**. El libro cuenta con un capítulo sobre **“El análisis básico del semen”**, a cargo de Dres. G. Cerezo Parra, L. M. López Pérez, S.A. González Ortiz, L. Sarabia y H.M. Rodríguez Hernández. Destacamos además el aporte del Dr. T. Kruger, con su capítulo **“El valor de la morfología espermática en la práctica clínica”** y el del Dr. S. Long con el capítulo **“Análisis de células redondas y semen: Importancia y determinación”**. A estos materiales se suman los aportes de los Dres. R. Lozano Hernández y J. Velasco Carrillo sobre el **“Impacto de las infecciones en la fertilidad masculina”** y el capítulo sobre **“Efectos tóxicos de la exposición a metales y plaguicidas sobre los espermatozoides, y su repercusión en la fertilidad”**, a cargo de los Dres. B. Quintanilla Vega, M. de J. Solís Heredia, A. Larrañaga Parrado y E. Rojas Prado.

Teniendo en cuenta la relevancia que ha tenido el Manual de Evaluación del Semen Humano, emitido por la Organización Mundial de la Salud desde su primera edición en el año 1980, y que ha presentado su Sexta Edición en 2021, es para nosotros un honor contar en este libro con el aporte del Dr. L. Björndahl, uno de los expertos que desarrolló la última edición, con su capítulo titulado **“Actualización 2021 sobre el examen básico del semen por la OMS y la ISO”**.

La evaluación del núcleo espermático ha cobrado vital relevancia en este compendio y por eso contamos con dos capítulos a cargo de la Dra. E. Baldi, experta a cargo de la elaboración del Manual de la OMS 6ta edición. El primero, junto con las Dras. M. Matorri, S. Marchiani y L. Tamburrino, es el capítulo titulado **“Origen de la fragmentación del ADN espermático: Papel de la apoptosis, inmadurez y estrés oxidativo”**, y el segundo, **“Fragmentación del ADN espermático. Fundamentos y metodología diagnóstica para el laboratorio de andrología”**, a cargo de los Dres. J. Cicaré, C. Avendaño y M.J. Munuce.

También en este libro destacamos la importancia que se le ha dado a los estudios genéticos asociados a la infertilidad masculina y es por eso que tenemos el gusto de incluir un capítulo titulado **“Técnicas citogenéticas aplicadas al estudio de la infertilidad masculina”**, a cargo de los Dres. O.A. Urbano, J. Calvo y J. Rueda. Teniendo en cuenta el advenimiento de las técnicas globales para el estudio de ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos y lípidos, así como de la bioinformática, se encontrará un capítulo sobre **“Estudios globales en Andrología: de la investigación al laboratorio clínico”**, a cargo de los Dres. M.H. Vazquez-Levin, G.L. Verón, A.A. Manjon, C. Mariatti y D. Catalano.

Con una visión innovadora sobre el espermatozoide, su rol en la fecundación y sus propiedades como *carrier* de drogas para otras patologías, se incluye un capítulo titulado **“Microrrobótica para el movimiento de espermatozoides controlado en forma remota”**, a cargo de la Dra. V. Magdanz.

El manual de la OMS también desarrolla en sus contenidos aspectos a la criopreservación de semen humano y espermatozoides recuperados de tejidos del tracto y de la vitrificación. Al respecto, destacamos los aportes de los Dres A. Del Valle y M.H. Bhat, con su capítulo **“Banco de espermatozoides humanos en Canadá”**, el capítulo **“Vitrificación de espermatozoides humanos: Efecto de crioprotectores y métodos de enfriamiento en la criopreservación espermática”** a cargo de los Dres. M. Wang, E. Isachenko, G. Rahimi, P. Kumar, P. Mallmann y V. Isachenko, y el capítulo **“Criopreservación de espermatozoides testiculares”**, a cargo de los Dres. R. Núñez Calonge y P. Caballero Peregrín. Dado que el estudio de la cinemática espermática sigue siendo de gran valor en el estudio del semen, el libro también incluye un capítulo titulado **“La importancia y las aplicaciones del análisis espermático asistido por computadora (CASA) en laboratorios de andrología y centros de reproducción asistida”**, a cargo de los Dres. G. van der Horst y L. Maree.

Teniendo en cuenta los informes sobre el efecto deletéreo de la edad y diversos factores propios o del entorno sobre la salud reproductiva masculina y las evidencias de la caída de la calidad seminal en las últimas décadas en otras regiones del globo, el libro incluye capítulos en dichas temáticas, uno titulado **“Impacto de la edad, los factores clínicos y socio-ambientales en la calidad del semen”**, a cargo de los Dres. G.L. Verón, R. Molina y M.H. Vazquez-Levin, y un capítulo **“Disminución de la calidad del semen en los últimos 30 años”**, a cargo de los Dres. L.R. Villagrán, N. Barrera, J. Montes y R. Sapiro.

El libro también incluye capítulos sobre los diferentes abordajes actuales para el tratamiento de la infertilidad masculina: **“Perspectiva actual del uso clínico de los**

**antioxidantes, para el tratamiento de la infertilidad masculina”,** a cargo de los Dres. B.J.M. Mayorga-Torres, M. Jodar, M. Leiva, D. Manau, A. Alcaraz Asencio, F. García, R. Oliva y J.M. Corral; **“La andrología en la era de las técnicas de reproducción asistida: La importancia del estrés oxidativo y la genética”** a cargo del Dr. J. Aitken; **“Técnicas de procesamiento del semen para inseminación”**, a cargo de los Dres. R. Núñez Calonge, P. Caballero Peregrín y G. Cerezo Parra y un capítulo sobre **“Técnicas de micromanipulación espermática en el laboratorio de reproducción asistida”**, a cargo de los Dres. S. Fleming y D. Morroll.

El libro cuenta con dos capítulos altamente relevantes en la temática de salud reproductiva como son la andropausia y la anticoncepción masculina. Al respecto de la primera temática, los Dres. C. Palma Ceppi, M. Marconi Toro, G.E. Ortiz Lara y S.A. Camarena Romero han aportado el capítulo **“Andropausia”**, que aborda una revisión actualizada de los diferentes aspectos del Síndrome el Hipogonadismo de Inicio Tardío, que incluye datos epidemiológicos, fisiopatológicos y relacionados con alternativas terapéuticas del mismo. En relación con la segunda temática, tenemos el honor de contar con la contribución de cargo de los Dres. C. Wang, W. Butt, MD, H.S. Lee y R. Swerdloff titulado **“Anticoncepción hormonal masculina: Una realidad”**.

Además de los capítulos que abordan aspectos clínicos y de laboratorio sobre salud reproductiva masculina, destacamos el aporte del Dr. C. De Jonge con **“La iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (MHRI): Historia y misión”**. Este capítulo describe el MRHI, sigla de la *Male Reproductive Health Initiative*, una colaboración mundial de expertos dedicada al avance de la ciencia y a la práctica de la medicina reproductiva masculina, que promueve la investigación de alta calidad tanto en ciencias básicas como clínicas, forjando colaboraciones con sociedades profesionales para contribuir a la educación e interacción con grupos de apoyo a pacientes y agencias de financiación.

Estamos orgullosos del material compilado, de acceso libre y gratuito, al que pueden acceder todos aquellos profesionales en formación y formados de habla hispana. Agradecemos al **Dr. Craig Niederberger**, Andrólogo renombrado de gran trayectoria internacional y hasta hace muy poco Editor en Jefe de la revista *Fertility and Sterility*, por haber leído el libro y enviado su comentario. Nuevamente agradecemos a todos y a cada uno de los autores de los capítulos de este libro que han aportado con su conocimiento a la educación permanente de los Andrólogos de habla hispana. Esperamos que los contenidos sean de interés para los lectores.

Biol. Gerardo Cerezo Parra, Dra. Rocío Nuñez Calonge y Dra. Mónica Vazquez-Levin

Editores

2023

# EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

Carlos Gerardo Salazar López Ortiz<sup>1</sup>

Pedro Cuapio Padilla<sup>2</sup>

José Carlos Salazar Trujillo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Director Médico Clínica de Reproducción Asistida Hospital Español HISPAREP. <sup>2</sup>Andrólogo – Embriólogo, Responsable del Laboratorio de Andrología, HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español. <sup>3</sup>Médico Asociado Clínica de Reproducción Asistida Hospital Español HISPAREP.

Autor Corresponsal: José Carlos Salazar Trujillo. Dirección: Av. Ejército Nacional 613 Primer piso Consultorio 101, Complejo Antonino Fernández, Miguel Hidalgo, Granada, Ciudad de México, CP 11520. Teléfono: (55)5250-6462. Correo electrónico: [salazarv@prodigy.net.mx](mailto:salazarv@prodigy.net.mx)

## Resumen

La intención de este capítulo será otorgar las herramientas básicas que permitan a todo médico de primer contacto abordar pacientes con infertilidad masculina e identificar sus principales causas, a fin de canalizar de manera temprana y brindar un correcto tratamiento de las patologías más comunes.

## Introducción

La infertilidad es un problema de salud pública que en los últimos años ha presentado un aumento en la incidencia y que afecta a 1 de cada 8 parejas, es decir, al 15-20% de las parejas a nivel mundial. Aproximadamente 1/3 de la infertilidad se atribuye a factores masculinos, 1/3 a femeninos y 1/3 de las parejas tendrán como diagnóstico infertilidad inexplicable o infertilidad idiopática (1,2) (Figura 1).

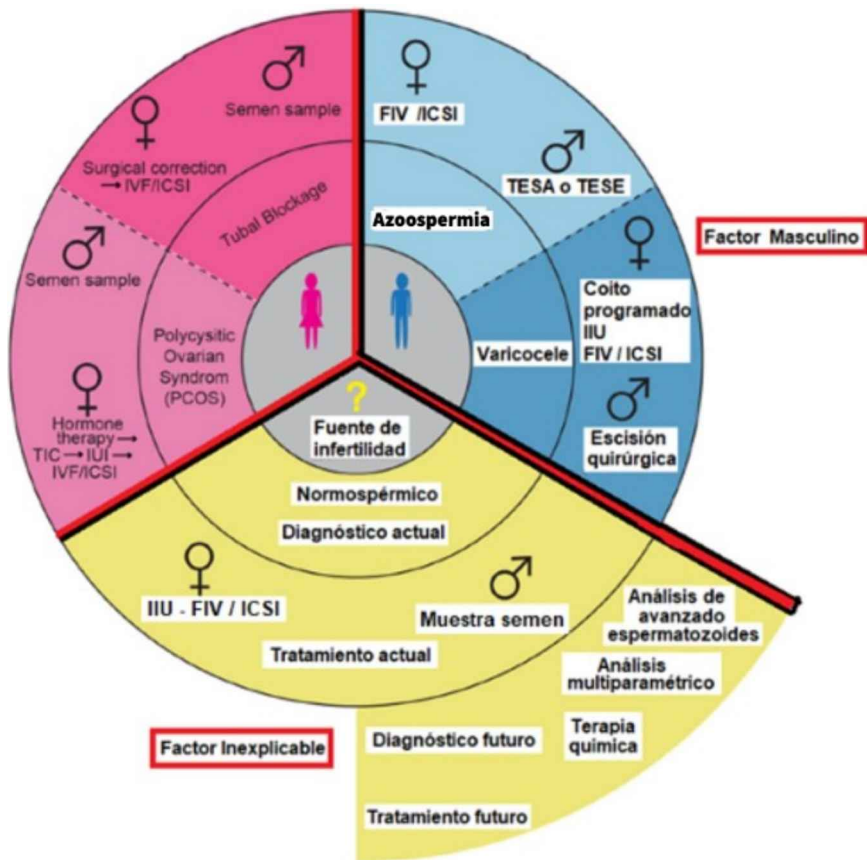
En general, los hombres son tan propensos como las mujeres a ser responsables de la infertilidad. En todo el mundo es probable que estas cifras se encuentren infravaloradas y México no es la excepción, ya que no contamos con estudios que valoren la prevalencia de nuestra población. En la mayoría de los casos, cuando los pacientes acuden a consulta con diagnósticos de infertilidad, el factor masculino normalmente es el menos estudiado, por lo que este capítulo tratará de otorgar las herramientas básicas para realizar una correcta historia clínica y anamnesis integrando diagnósticos certeros que permitan dar un correcto manejo o tratamiento de la infertilidad masculina.

La infertilidad masculina se puede estudiar bajo distintos rubros evaluando cada uno de ellos: anatómico, infeccioso, endócrino, genético y funcional, iniciando siempre con una evaluación masculina detallada a través de una historia clínica, examen físico y análisis seminal para así poder identificar condiciones reversibles o factores que requieran de tratamientos específicos (3).

Es importante tener en cuenta que en algunos casos se necesitan estudios adicionales al análisis seminal debido a que el análisis de semen no proporciona información sobre el estado interno de los espermatozoides, lo que puede ser una fuente de infertilidad inexplicable. Estudios informan que hasta el 40% de los hombres de parejas con pérdida recurrente del embarazo presentaban concentración y motilidad normales pero también alteraciones cromosómicas. Además, la función y el grado de los defectos del ADN espermático son controvertidos, hay

ejemplos en los que incluso con un análisis de semen normal, los hombres pueden tener espermatozoides con componentes anormales.

El espermatozoide es la célula encargada de llevar y transmitir la información genética del padre. Además, durante la fecundación aporta al ovocito el centriolo necesario para la división celular y un factor activador llamado oscilina. Ya que el espermatozoide aporta su genoma haploide, es importante la integridad de su ácido desoxirribonucleico (ADN) para la descendencia (4,5).



**Figura 1.** Diagnósticos y tratamientos. El factor masculino se indica en azul. Está presente en el factor inexplicable. Se muestran las herramientas de diagnóstico y los tratamientos. TESA (aspiración de esperma testicular), TESE (extracción de esperma testicular), IUI (inseminación intrauterina), FIV (fertilización in vitro) e ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides). Tomada y modificada de Turner et al, 2020.

Para un estudio adecuado de infertilidad masculina se deben conocer las diferentes opciones en su evaluación como son a) el análisis de semen, b) pruebas especiales, c) técnicas de reproducción asistida y d) pruebas genéticas (4).

La historia clínica nos permitirá identificar factores de riesgo desde edad, peso, talla, índice de masa corporal (IMC) así como antecedentes personales patológicos (antecedente de torsión testicular, orquitis, epididimitis, trauma) y no patológicos (tabaco, alcohol, drogas, radioterapia, quimioterapia, anabólicos, función sexual, púbarca, desarrollo sexual, descenso testicular) e inclusive antecedentes traumáticos o quirúrgicos, todo aquello que puedan poner en riesgo la fertilidad de la pareja, con el fin de integrar síntomas a través de los signos presentados por los pacientes.

La exploración física debe de ser sistemática, es decir, debe llevar un orden idealmente de cabeza a pies, valorando datos clínicos como signos de obesidad, de endocrinopatías (estrías, acantosis), tamaño de glándula tiroides, presencia o ausencia de ginecomastia, así como genitales externos y la presencia de testículos en bolsas escrotales, volúmenes testiculares, distribución de vello, caracteres sexuales secundarios, epidídimo, cordones espermáticos y en su interior los conductos deferentes, sin olvidar valorar a nuestros pacientes a través de la escala de Tanner.

El pene debe de ser valorado observando pliegues, la presencia o ausencia de curvaturas, así como descartar presencia de hipospadias o alteraciones anatómicas que dificulten la eyaculación. Durante la exploración física también se valora la presencia, consistencia y volumen testicular a través del orquidómetro de Pradder, que mide el largo y ancho testicular mediante la fórmula de Lambert, ya que los testículos no presentan una forma esférica sino una forma elipsoidal.

Lo anterior se mide por medio de la siguiente fórmula:  $0,71x (\text{Longitud} \times \text{Ancho}^2)$  o bien  $(\text{Longitud} \times \text{Ancho} \times \text{Grosor} \times 0,5236)$ . Volúmenes menores a 15 ml se consideraran pequeños (criptorquidia). Independientemente del método de elección debemos de recordar que el estándar de referencia para medición de volúmenes testiculares continúa siendo el ultrasonido testicular ya que posee mayor especificidad y sensibilidad que el orquidómetro.

El ultrasonido nos permite valorar de manera sistemática y detallada el resto de los genitales internos, otorgándonos información valiosa en conjunto con la morfología y las características ecogénicas del tejido testicular (lesiones difusas, concéntricas, así como hipoecoicas o hiperecoicas e inclusive presencia de micro litiasis, hidrocele). Es importante recordar que al hablar de volúmenes testiculares por ultrasonido el corte de normalidad será por arriba de los 12 cc (6).

Los cordones espermáticos se deben valorar desde una posición supina y erecta permitiendo detectar así la presencia o ausencia de varicocele, una de las patologías más comunes al momento de la exploración física que afecta indiscutiblemente la fertilidad en menor o mayor grado dependiendo de etapa clínica en la que se encuentre. El varicocele se clasifica acorde a los hallazgos en la exploración física (realizando maniobra de Valsalva) y visual. Se clasifica del 0-3 dependiendo de estos hallazgos. Se recomienda realizar ultrasonido testicular con Doppler para su correcta valoración (2,3) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Grados de varicocele. Se muestra el tipo de varicocele y la opción de palpar o realizar el ultrasonido.

Grado	Palpable	Clínica
0	No palpable	No visible (Hallazgo ultrasonográfico)
1	Palpable (con Valsalva)	No Visible
2	Palpable con reposo	No Visible
3	Palpable con reposo	Visible con reposo

Se recomienda el manejo expectante en aquellos pacientes con varicocele no palpable e indoloro y el considerar un tratamientos quirúrgicos dependerá de la sintomatología presentada y del grado clínico que presente el paciente ya que la varicocelectomía tiene una tasa de éxito del 55-70%, por lo que se concluye que el 40 % restante de pacientes no presentan una mejoría clínica posterior a la cirugía (8,9).

Otra alteración anatómica es la criptorquidia. Ésta es una alteración congénita frecuente caracterizada por la ausencia de uno o ambos testículos en la bolsa escrotal. Se encuentra en 5% de los recién nacidos modificándose esta cifra a 2% ya que en algunos casos hay corrección espontánea a lo largo de los primeros 3 meses de vida. En 20% de los casos de criptorquidia, los testículos no se lograrán palpar ya que la localización será a nivel de cavidad abdominal. La causa de esta patología es multifactorial aunque el factor determinante es una anomalía endocrina, por lo que se verá afectada la fase de descenso testicular transabdominal o inguinal dando como



resultado criptorquidia. Esto resulta secundario a una disfunción en la sensibilidad y producción de andrógenos esenciales para el descenso testicular en ambas fases.

### Análisis de semen

El análisis seminal (OMS 2020) consta de un eyaculado, una mezcla de aportaciones de diferentes glándulas como la próstata, las vesículas seminales, Cowper y Littre. Se produce a partir de una suspensión concentrada de espermatozoides almacenada en los epidídimos emparejados, mezclada y diluida principalmente por el líquido prostático en la uretra y seguido del vaciado de la secreción de las vesículas seminales. Las fracciones secuenciales no están compuestas por igual. El eyaculado tiene dos atributos cuantificables principales.

El número de espermatozoides refleja la producción de espermatozoides por los testículos, la permeabilidad del sistema de conductos posttesticulares, la eficacia de las contracciones del músculo liso en los epidídimos y los conductos deferentes para transportar activamente los espermatozoides a la uretra, y la eficiencia eréctil de la eyaculación para expulsar un eyaculado rico en esperma. El volumen de líquido que aportan las distintas glándulas accesorias refleja la actividad secretora de las glándulas y las siguientes contracciones del músculo liso que vacía cada glándula. La vitalidad, motilidad y morfología, junto con la composición de los fluidos del eyaculado, son importantes para la función de los espermatozoides. Existe evidencia de que el volumen total y el contenido de espermatozoides de los eyaculados varían según las circunstancias en las que se produce el eyaculado. Los eyaculados producidos por la masturbación y recolectados en recipientes en una habitación cercana al laboratorio pueden resultar en un rendimiento menor que los recuperados de condones no espermicidas usados durante las relaciones sexuales en el hogar. Esta diferencia puede reflejar un nivel y duración diferente de la excitación sexual, ya que el tiempo dedicado a producir una muestra mediante la masturbación también influye en el volumen y contenido de la eyaculación.

El análisis del semen es usado para evaluar la capacidad fértil del hombre. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una serie de parámetros que relacionan la calidad del semen con la fertilidad. Las características analizadas son: volumen, pH, número de espermatozoides por unidad de volumen, motilidad, viabilidad y morfología. En el 2010 se publicó la información del 5º manual donde se mencionan los parámetros macroscópicos y microscópicos para poder determinar la calidad seminal de un individuo, indicando en las pruebas macroscópicas que para una muestra seminal normal el volumen mínimo es de 1.5 mL, licuefacción (líquido homogéneo) en un rango de 30 a 60 min, viscosidad, color gris opalescente, sin grumos y con un pH de 7.2 a 7.8. En las pruebas microscópicas se debe tener movilidad espermática  $\geq$  al 40%, vitalidad  $\geq$  al 58%, concentración  $\geq$  a 15 millones de espermatozoides por mL y morfología normal  $\geq$  al 4%. Actualmente acaba de publicarse la actualización del 2020. En la **Tabla 2** se muestran los valores actuales y anteriores de evaluación seminal (WHO 2020). Se estima que aproximadamente del 10 al 15% de los varones infértiles presentan parámetros dentro de los rangos normales (10,11).

**Tabla 2.** Valores de referencia de los parámetros del semen publicados en manuales consecutivos de la OMS.

Manual OMS Versión	OMS 1980 1st	OMS 1987 2nd	OMS 1992 3rd	OMS 1999 4th	OMS 2010 5th	OMS 2020 6th
Característica del semen						
Volumen (ml)	ND	$\geq 2$	$\geq 2$	$\geq 2$	1.5	1.4

Recuento de espermatozoides (mill)	20 - 200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15	16
Recuento total de espermatozoides (mill/ml)	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	39	≥39
Motilidad total (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	40	42
Motilidad progresiva (%)	≥ 2 <sup>‡</sup>	≥ 25	≥ 20 (Grado a)	≥ 25 (Grado a)	32 (Grado a+b)	30
Vitalidad (%)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58	54
Morfología (%) formas normales	80.5	≥ 50	≥ 30 <sup>§</sup>	14 <sup>¶</sup>	4 //	4
Leucocitos (mill/ml)	< 4.7	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0
<p>* Límite de referencia inferior obtenido a partir del valor del percentil quinto. Basado en criterios de fertilidad; † Grado a, motilidad progresiva rápida (25%); Grado b, motilidad progresiva lenta / lenta (5-25 ms - 1); normal, 50% de motilidad (Grado a + b) dentro de los 60 min de la eyaculación; ‡ Progresión hacia adelante (escala 0-3); § Valor arbitrario; Valor no definido, pero se sugiere un criterio estricto; // Criterio estricto (Tygerberg). OMS: Organización Mundial de la Salud; ND: no definido. Tomado y modificado de Suresh et al, 2016.</p>						

Una vez evaluado el análisis seminal y en base a los parámetros de la OMS, se define las diferentes alteraciones seminales que puede tener un eyaculado y se da un diagnóstico. Dentro de las etiologías o alteraciones que pueden encontrarse, mencionamos las siguientes:

#### Oligozoospermia

La oligospermia puede deberse a varios factores y a menudo es idiopática. Suele asociarse con otras alteraciones en el análisis de semen como la astenozoospermia o teratozoospermia. Los pacientes con oligozoospermia deben evaluarse con estudios hormonales para descartar la presencia de endocrinopatías. Cuando el recuento de espermatozoides desciende a niveles inferiores a 5 millones requiere evaluación con estudios genéticos, principalmente cariotipo y microdelección del cromosoma Y.

#### Astenozoospermia

La astenozoospermia es un término que se aplica cuando hay una disminución de la movilidad en los espermatozoides. En este caso, se necesitan estudios de viabilidad espermática para descartar necrozoospermia. También se debe plantear la sospecha de síndrome de cilios inmóviles, que debe excluirse mediante una historia (infecciones recurrentes del tracto respiratorio), examen físico (situs inversus que denota síndrome de Kartagener en el 50% de los casos) y microscopía electrónica que muestre la ausencia de los brazos de dineína, por lo que

hay 100% de inmóviles. La baja motilidad de los espermatozoides puede ocurrir como consecuencia de condiciones asociadas con el estrés oxidativo, como el varicocele y la exposición al calor o a sustancias químicas. También se reconocen infecciones genitales y más comúnmente, etiologías idiopáticas.

### Teratozoospermia

La importancia clínica, el tratamiento y las implicaciones de la teratozoospermia siguen sin estar claras. Muchos estudios han explorado la influencia de criterios morfológicos estrictos en la inseminación intrauterina (IIU), la inseminación in vitro (FIV) y el embarazo con resultados mixtos. Condiciones como el varicocele, la exposición a fármacos tóxicos, sustancias químicas, calor y enfermedades están asociadas con una morfología anormal de los espermatozoides.

### Azoospermia

El primer paso en la evaluación de un paciente con azoospermia es proceder con un enfoque de diagnóstico y tratamiento organizado. Es obligatorio un examen físico completo que enfatice el tamaño testicular y la presencia o ausencia de los conductos deferentes. Los estudios de laboratorio, niveles séricos de FSH y testosterona, análisis del cariotipo en sangre y las pruebas de microdelección de Y y del volumen de semen también son de igual importancia. Un tamaño testicular adecuado junto con niveles normales de FSH indica la presencia probable de espermatogénesis normal y sugiere "azoospermia obstructiva". Un testículo de pequeño tamaño, por otro lado, con altos niveles séricos de FSH sugiere insuficiencia testicular o "azoospermia no obstructiva" (12,13).

### Pruebas complementarias

Dado que la selección natural permite que solo los espermatozoides con ADN intacto fertilicen, las pruebas de dicha integridad del ADN se han vuelto más relevantes debido al uso cada vez mayor de técnicas de reproducción asistida (TRA). El daño del ADN de los espermatozoides afecta la fertilidad y el resultado del embarazo, situaciones que no pueden detectarse mediante análisis de semen de rutina. Se han desarrollado varias pruebas de fragmentación del ADN durante los últimos 30 años pero todavía existen muchos desafíos relacionados con la estandarización de dichas técnicas, además de que muchas de ellas son costosas de realizar. Estas pruebas son:

#### Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA)

Utiliza un tinte metacromático que tiene una propiedad fluorescente diferente en presencia de ADN monocatenario (rojo) o bicatenario (verde). La prueba es fácil y rápida, pero está limitada por la subjetividad interobservador y el rápido desvanecimiento de la fluorescencia. Mide la susceptibilidad del ADN del espermatozoide a la rotura y permite el análisis de gran cantidad de espermatozoides. Sin embargo, proporciona solo el porcentaje de espermatozoides con mayor susceptibilidad a las roturas del ADN pero no mucha información sobre la cantidad de daño del ADN en un solo espermatozoide.

#### Ensayo cometa

Es una electroforesis en gel que se realiza en condiciones neutras o alcalinas. Es posible analizar muchas células y los porcentajes de roturas de ADN simples y dobles son fácilmente detectables, pero la configuración de la técnica requiere mucha mano de obra, necesita un software específico para analizar los resultados y el daño del ADN puede sobreestimarse.

## La prueba de dispersión de cromatina espermática (Halo)

La prueba del halo puede detectar fácilmente el número de roturas de ADN de una o dos hebras de los espermatozoides simples en un gran número de células. Al igual que con el ensayo de cometa, la configuración no es fácil, se necesita un software dedicado y el daño al ADN se puede sobreestimar.

## Evaluación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se han detectado ROS en el semen de muchos hombres infértiles con leucocitos elevados. La prueba es particularmente útil para detectar la presencia de estrés oxidativo debido al exceso de radicales libres en el semen como causa potencial de infertilidad en los hombres. En ausencia de un protocolo estándar para evaluar oxidantes seminales, no hay consenso en este momento con respecto a la inclusión del análisis como parte del diagnóstico de rutina de un varón infértil. Los siguientes son varios métodos para medir el estrés oxidativo seminal.

### Quimioluminiscencia

El ensayo de quimioluminiscencia es el método más común para evaluar la concentración de ROS en el semen. El luminol es una sonda permeable a la membrana altamente sensible que reacciona con una variedad de ROS a pH neutro y se puede utilizar para medir la SG tanto extracelular como intracelular. Las ROS tienen una vida útil muy corta y deben medirse rápidamente después de la recolección de semen. La reacción produce fotones que se convierten en señales eléctricas que se miden con un luminómetro. Los datos se expresan como recuentos por minuto (cpm), o como unidades de luz relativa (RLU), o como milivoltios por segundo ( $\text{mV s}^{-1}$ ).

### Prueba de nitro azul tetrazolio (NBT)

NBT es un compuesto de tetrazolio aromático nitro-sustituido, soluble en agua, amarillo, que reacciona con los iones superóxido celulares para formar un derivado de formazán. Esto se puede medir cuantitativamente con un espectrofotómetro. La reducción de NBT es una prueba fácilmente disponible, fácil de realizar, económica y altamente sensible.

### Citometría de flujo

La citometría de flujo distingue los espermatozoides viables y no viables utilizando tintes específicos como el yoduro de propidio (PI) y Yopro-1. Sin embargo, la técnica implica el uso de costosos instrumentos de citómetro de flujo, personal capacitado y software para el análisis de datos.

### Determinación de antioxidantes seminales

La medición de los niveles de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa proporciona una evaluación indirecta del nivel de oxidación seminal. Se sabe que estas enzimas antioxidantes naturales protegen a los espermatozoides contra el daño oxidativo.<sup>10</sup>

## Estudios hormonales

Se solicitarán análisis hormonales únicamente en aquellos pacientes en los cuales se sospeche patología de base ya que no se recomienda como estudio básico en pacientes masculinos con infertilidad. Estas patologías pueden ser: disminución de libido, disfunción eréctil, oligozoospermia y durante el abordaje de azoospermia cuando se sospeche de causa obstructiva, criptorquidia y atrofia testicular (7).

Se solicitarán niveles hormonales de FSH, LH, Testosterona (total y libre), Estradiol, TSH y Prolactina. Estos dos últimos en aquellos pacientes con sospecha de patologías como hiperprolactinemia secundaria a prolactinomas con datos clínicos como diplopía cefalea, tc ya que se estima que hasta en el 40% de las hiperprolactinemias estarán asociadas a prolactinomas. La medición testosterona debe de realizarse entre las 8 y 10 am, siempre solicitando fracción libre en aquellos pacientes en los cuales se sospecha de hipogonadismo. La importancia de medir TSH radica en que en pacientes con diagnósticos de hipotiroidismo se ha observado una disfunción en el epidídimo y funcionamiento de células de Sertoli, lo que produce una disminución de niveles de SHBG, LH y FSH y una disminución en niveles de volumen seminal, movilidad espermática y volúmenes testiculares (2).

Pacientes en quien se sospeche la presencia de hipogonadismo hipergonadotrópico (FSH y LH elevadas con testosterona baja) se observará una deficiencia testicular con disminución en la producción espermática (Sx Klinefelter). En cuanto a pacientes con sospecha de hipogonadismo hipogonadotrópico (FSH y LH bajas) así como de esteroides sexuales, se debe de descartar patologías como Síndrome de Kallman, alteraciones ligadas X, tumores.

### **Cultivos seminales**

Otro estudio importante y que se debe tener en cuenta durante el abordaje de pareja infértil es el uso de cultivos seminales, ya que en pacientes con antecedentes de infecciones en tracto genital o con hallazgos que sugieran su presencia durante la exploración física o en análisis seminal, se deberá descartar la presencia de estas. Se ha observado una prevalencia de hasta 20-35 % en pacientes masculinos estudiados por infertilidad, estas infecciones pueden llegar a presentar alteraciones en los parámetros seminales así como distintas patologías como prostatitis, uretritis, orquitis y epididimitis siendo los responsables en la mayoría de los *Escherichia coli*, *Chlamydia Trachomatis*, *Ureaplasma realyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*. El tratamiento será a base de antibiótico sugerido por antibiograma así como el uso de antiinflamatorios y analgésicos en algunos de los casos (2).

### **Pruebas genéticas**

La contribución de la genética al conocimiento de la infertilidad masculina es uno de los temas más estudiados en medicina reproductiva. Se reconoce claramente la influencia de varias alteraciones genéticas que se detallan en revisiones excelentes sobre el tema, así como en revisiones específicas del paciente con azoospermia. Por lo general, los pacientes con afectación en los cromosomas sexuales, como el síndrome de Klinefelter (47,XXY) y las microdeleciones del cromosoma Y, son infértiles.

No obstante, el advenimiento de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad como la fertilización in vitro, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y sobre todo la combinación de esta última con la recuperación testicular de espermatozoides, ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad masculina y permitido que estos pacientes tengan descendencia propia. Sin embargo, estos procedimientos implican un riesgo importante de transmisión de estas enfermedades a la descendencia, por ejemplo, el paciente con síndrome de Klinefelter tiene un riesgo teórico de tener 50% de espermatozoides con contenido cromosómico aneuploide (con un cromosoma de más o de menos) y que al utilizarlos en un procedimiento de reproducción asistida estos espermatozoides transmitan la constitución cromosómica anormal (un cromosoma X adicional) al embrión. En el caso de microdeleción del cromosoma Y, ésta se transferiría al 100%

de los hijos varones, que también serían infértiles. En la **Tabla 3** se mencionan las variantes genéticas asociadas a la infertilidad masculina (14,15).

**Tabla 3.** Variantes genéticas principales asociadas con infertilidad masculina, metodología para su diagnóstico e implicaciones de transmisión.

Variante genética	Fenotipo	Prueba genética diagnóstica	Implicaciones genéticas
Síndrome de Klinefelter (47,XXY)	Hipogonadismo hipergonatrópico, azoospermia	Cariotipo en sangre periférica, otros tejidos, o ambos. FISH para cromosomas sexuales (descartar mosaicos)	Riesgo de transmisión por ICSI
Otras variantes cromosómicas: alteraciones en cromosomas sexuales, translocaciones de autosomas	Variable (infertilidad, insuficiencia testicular)	Cariotipo en sangre periférica, otros tejidos, o ambos	Riesgo de transmisión por técnicas de reproducción asistida
Microdeleciones del cromosoma Y			
AZFa	Principalmente síndrome de sólo células de Sertoli.	Detección de STSs del Y por PCR	100% de transmisión a hijos varones por técnicas de reproducción asistida
AZFb, AZFc, AZFb+c	Oligozoospermia severa o azoospermia.	Detección de STSs del Y por PCR	100% de transmisión a hijos varones por técnicas de reproducción asistida
gr/gr	¿Oligozoospermia?	Detección de STSs del Y por PCR	En teoría 100% a los hijos varones, implicaciones desconocidas
b2/b3, b2/b4	¿Oligozoospermia?	Detección de STSs del Y por PCR	En teoría 100% a los hijos varones, implicaciones desconocidas

Mutaciones en el gen <i>CFTR</i>	Azoospermia obstructiva por obstrucción idiopática epididimal, o por ausencia congénita de vasos deferentes. Fibrosis quística.	Búsqueda de mutaciones más frecuentes del gen <i>CFTR</i> . Secuenciación completa del gen <i>CFTR</i> .	Riesgo de transmisión por técnicas de reproducción asistida
Mutaciones en el receptor de andrógenos	Enfermedad de Kennedy. Cuadro de insensibilidad a los andrógenos.	Búsqueda de tamaño del repetido CAG en el exón 1. Secuenciación del receptor de andrógenos	Trasmisión natural. Riesgo teórico de transmisión por técnicas de reproducción asistida
Mutaciones en <i>KAL-1</i> , <i>KAL-2</i> ( <i>FGFR1</i> ), <i>PROK2</i> / <i>PROK2R</i> , <i>CHD7</i> <i>FGF8</i> <i>GnRH1</i> / <i>GNRHR</i> , <i>KISS1</i> / <i>GPR54</i> , <i>TAC3</i> / <i>TAC3R</i>	Deficiencia aislada de FSH o LH, retraso o trastorno del desarrollo sexual, insuficiencia testicular.	Secuenciación del gen o genes relacionados	Riesgo teórico de transmisión por técnicas de reproducción asistida
Mutaciones en <i>FSHB</i> , <i>LHB</i> o sus receptores ( <i>FSHR</i> , <i>LHCGR</i> )	Deficiencia aislada de FSH o LH, retraso o trastorno del desarrollo sexual, insuficiencia testicular	Secuenciación del gen o genes relacionados	Riesgo teórico de transmisión por técnicas de reproducción asistida

### Pruebas genéticas e infertilidad del factor masculino

Se recomienda realizar pruebas genéticas cuando exista una o más de las siguientes condiciones:

1. Azoospermia u oligospermia grave.
2. Testículo de tamaño pequeño o ausencia de conductos deferentes.
3. Varios abortos espontáneos.

También se deben realizar estudios para determinar las posibles alteraciones genéticas por factor masculino. Éstas son:

#### Aneuploidía cromosómica en espermatozoides

La aneuploidía es una anomalía en el número de cromosomas y se produce como resultado de un defecto meiótico durante la espermatogénesis. La hibridación fluorescente in situ proporciona un método para probar la aneuploidía cromosómica de los espermatozoides. Estas pruebas detectan anomalías en los cromosomas (p. Ej., microdeleciones, translocaciones del cromosoma Y o la presencia de mutaciones genéticas específicas, como el gen de la fibrosis quística), que están

asociadas con la obstrucción o la falta de los conductos deferentes. Se recomienda realizar pruebas para detectar enfermedades genéticas cuando la infertilidad en hombres con < 5% espermatozoides móviles totales y podría estar relacionada con deleciones de genes, mutaciones o anomalías cromosómicas.

#### Anormalidad cromosómica

El cariotipo de algunos hombres infértiles muestra un cromosoma X adicional; por ejemplo, en lugar del cariotipo 47 XXY, tienen un cariotipo 46 XY. Esta condición se conoce como "síndrome de Klinefelter" y resulta en infertilidad masculina. Durante una prueba de cariotipo, se pueden encontrar otras anomalías cromosómicas, especialmente en parejas que tienen varios abortos espontáneos y / o infertilidad inexplicable.

#### Microdeleciones del cromosoma Y

Algunos hombres con azoospermia u oligospermia grave tienen deleciones en el cromosoma Y, conocido como gen DAZ. Su cariotipo es normal (46 XY) pero una evaluación adicional del cromosoma Y muestra algunas secciones faltantes de este cromosoma Y. La descendencia masculina también heredará dicha delección del cromosoma Y.

#### Mutaciones de gen único / fibrosis quística (FQ)

Aunque la FQ es una afección genética que afecta los pulmones, una forma "variante" de FQ afecta la fertilidad masculina y se asocia con la ausencia total o parcial de los conductos deferentes.

Los espermatozoides pueden recuperarse de los testículos en estos hombres mediante extracción quirúrgica y criopreservarse para ser utilizados posteriormente para FIV o ICSI. Es importante evaluar a las parejas femeninas en busca de mutaciones de la FQ para evitar un riesgo significativo de tener un hijo con FQ (10).

### Conclusiones

Es importante saber abordar al paciente infértil por factor masculino, conocer inicialmente el diagnóstico, las posibles alternativas de tratamiento y las pruebas que se puedan aplicar.

Asimismo se debe realizar la exploración física del varón para descartar alguna etiología previa a los procedimientos de reproducción, posteriormente se debe realizar un análisis seminal completo en base a la normativa de la OMS y determinar la calidad del mismo. Se sabe que no es suficiente con el análisis de semen, por lo que se requiere saber el fundamento de aquellas pruebas complementarias que ayuden en la evaluación del gameto masculino.

Se debe de tomar en consideración además la evaluación integral de la pareja, en base a los estudios de ambos integrantes, orientar al tipo de técnica de baja o alta complejidad para con ello aumentar las posibilidades de éxito.

### Referencias

1. Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am.* 2014 Feb;41(1):195-204. doi: 10.1016/j.ucl.2013.08.006. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24286777.
2. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, Arafa M, Panner Selvam MK, Shah R. Male infertility. *Lancet.* 2021 Jan 23;397(10271):319-333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33308486.
3. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and Treatment



- of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):36-43. doi: 10.1097/JU.0000000000001521. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33295257.
4. Katerina A. Turner, Amarnath Rambhatla, Samantha Schon, Ashok Agarwal , Stephen A. Krawetz, James M. Dupree and Tomer Avidor-Reiss. Male Infertility is a Women's Health Issue—Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells* 2020, 9, 990; doi:10.3390/cells9040990
  5. Portella, Jimmy; Sepúlveda, Soledad. Evaluación del factor masculino en reproducción asistida: nuevas tecnologías *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, vol. 57, núm. 1, 2011, pp. 21-27.
  6. Pozza C, Kanakis G, Carlomagno F, Lemma A, Pofi R, Tenuta M, Minnetti M, Tarsitano MG, Sesti F, Paoli D, Anzuini A, Lenzi A, Isidori AM, Gianfrilli D. Testicular ultrasound score: A new proposal for a scoring system to predict testicular function. *Andrology*. 2020 Sep;8(5):1051-1063. doi: 10.1111/andr.12822. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32445591; PMCID: PMC7497152.
  7. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline PART II. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):44-51. doi: 10.1097/JU.0000000000001520. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33295258.
  8. Shomarufov AB, Bozhedomov VA, Giyasov SI, Abbosov SA, Kamalov AA. [Varicocele: a critical analysis of predictors for male reproductive function recovery]. *Urologiia*. 2020 Dec;(6):148-154. Russian. PMID: 33377695.
  9. Falticeanu AA, Lebecque O, Dupont M. Systematic scrotum ultrasound in male infertility: what to look for. *Med Ultrason*. 2020 Sep 5;22(3):364-369. doi: 10.11152/mu-2491. Epub 2020 May 7. PMID: 32399545.
  10. Sikka SC, Hellstrom WJ. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J Androl*. 2016 May-Jun;18(3):392-401. doi: 10.4103/1008-682X.179161. PMID: 27056346; PMCID:
  11. WHO Manual. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edition, Geneva. World Health Organization Manual. Switzerland, 2021. Licence: [CC BY-NC-SA 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).
  12. Agarwal et al. (eds.), *Andrological Evaluation of Male Infertility*, Springer International Publishing Switzerland 2016, DOI 10.1007/978-3-319-26797-5\_12.
  13. Majzoub, A., Sabanegh, E. (2016). *Diagnostic tests in the evaluation of male fertility* (pp. 1-10). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5>.
  14. Piña-Aguilar RE, Chima-Galán MC, Yerena-de-Vega MCA, Regalado-Hernández MA y col. Variantes genéticas asociadas con infertilidad masculina en pacientes mexicanos. *Ginecol Obstet Mex* 2013;81:245-258.
  15. O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*. 2010 Jan;93(1):1-12. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.045. PMID: 20103481.



# FISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Rosalina Reyes Luna<sup>1</sup>  
Hugo Manuel Rodríguez Hernández<sup>2</sup>  
Gerardo Cerezo Parra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) Puebla, México. <sup>2</sup>Centro de Ginecología, Genética y Reproducción Asistida "CGYRA". Hospital del Pacífico, Acapulco, Guerrero, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Espermatozoides LÁFER y FERTIMÉXICO, Ciudad de México, México y Guadalajara, Jalisco, México.

Autor correspondiente: Dra. Rosalina Reyes Luna. Correo electrónico: [rreyesluna@hotmail.com](mailto:rreyesluna@hotmail.com)

La reproducción es el proceso por el cual los organismos crean descendientes. Es una característica común que presentan todos los seres vivos y es esencial para asegurar la vida de las especies. En la reproducción humana, dos clases de células sexuales o gametos se encuentran involucrados, el espermatozoide, que es el gameto masculino y el óvulo, el gameto femenino.

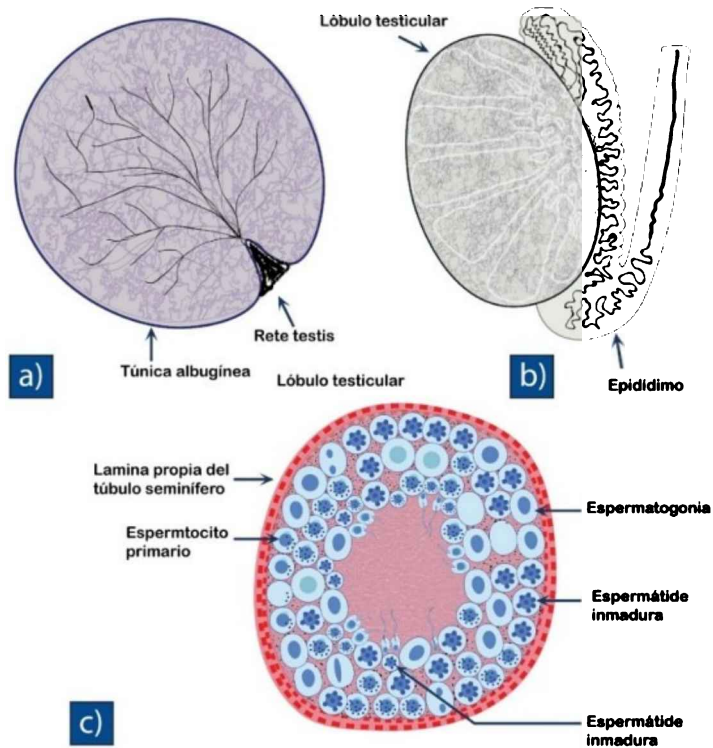
A partir de un grupo de células madre que se renuevan automáticamente, las células germinales masculinas se desarrollan en los túbulos seminíferos de los testículos a lo largo de la vida, desde la pubertad hasta la vejez (1). A este proceso se le denomina espermatogénesis, se inicia a partir de células denominadas espermatogonias, que presentan divisiones celulares y modificaciones morfológicas para dar lugar a los espermatozoides maduros.

## Testículos

Los testículos humanos son dos órganos con forma ovoidea, de superficie lisa, con un diámetro de 2,5 × 4 cm que se encuentran contenidos en una cápsula de tejido conectivo, la túnica albugínea. El parénquima de los testículos se encuentra dividido en unos 370 lóbulos (Figura 1A), estos consisten en túbulos seminíferos y tejido intertubular, que contienen grupos de células endocrinas, las células de Leydig y otras adicionales. Los túbulos seminíferos son asas en espiral (Figura 1B), sus extremos se abren a los espacios de la *rete testis* (2). El líquido secretado por los túbulos seminíferos es conducido de la *rete testis* al conducto eferente y depositado en el epidídimo.

## Estructura de los túbulos seminíferos

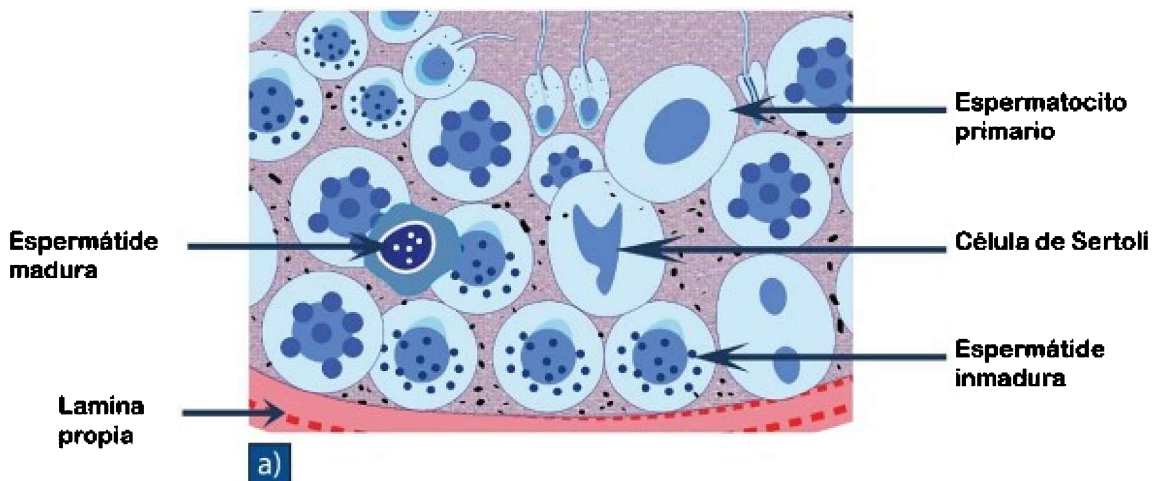
Los túbulos seminíferos están constituidos del epitelio germinal y tejido peritubular (lámina propia) (Figura 1C). El diámetro promedio de los túbulos es de aproximadamente 180 µm, la altura del epitelio germinal es de 80 µm y el grosor del tejido peritubular es de 8 µm. El epitelio germinal consiste de células en diferentes estados de desarrollo que se denominan espermatogonias, espermatocitos primarios, secundarios y espermátides. Estas células se encuentran dentro de invaginaciones de las células de Sertoli (Figura 2A).



**Figura 1** (A) Dibujo de una sección transversal de un testículo humano incluido en parafina. (B) Dibujo semiesquemático del arreglo de los túbulos seminíferos en el testículo humano y del sistema de ductos en el epidídimo. (C) Dibujo de una sección transversal de un túbulo seminífero.

Las células de Sertoli están conectadas por uniones estrechas a través de sus membranas plasmáticas que separan el epitelio germinal en un compartimento basal y adluminal. Las "uniones estrechas" forman la barrera hemato-testicular de los testículos. Durante la maduración, las células germinales atraviesan esta barrera y entran al compartimento adluminal donde encuentran protección de sustancias extrañas. Otras funciones de las células de Sertoli son (3).

1. Sustento y nutrición para las células germinales.
2. Liberación de las espermátides a la luz del túbulo seminífero (espermiación).
3. Producción de sustancias endocrinas y parácrinas para la regulación de la espermatogénesis.
4. Secreción de una proteína (ABP) que es necesaria para el mantenimiento de una concentración adecuada de testosterona en el epitelio seminífero.
5. Interacción endocrina con las Células de Leydig.



**Figura 2.** Dibujo de una sección del epitelio germinal en el túbulo seminífero.

El tejido peritubular (lamina propia de los túbulos seminíferos) consiste en aproximadamente 5 capas de mioblastos entremezclados con tejido conectivo. Los mioblastos provocan contracciones peristálticas del túbulo seminífero que transportan a los espermatozoides inmóviles al *rete testis* (4). El espesor del tejido peritubular es de alrededor de 8  $\mu\text{m}$ .

## Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo en donde una población de células germinales produce espermatozoides. Se inicia en la pubertad después de un largo período de preparación en el feto y el infante. Se pueden distinguir dos etapas principales: 1) la espermatocitogénesis, que corresponde a la diferenciación de las espermatogonias hasta las espermátides; esta etapa incluye varias divisiones mitóticas y las dos divisiones meióticas y 2) la espermiogénesis que se refiere a la transformación de las espermátides hasta los espermatozoides y no incluye divisiones celulares (5).

1.- En la espermatocitogénesis, las células espermatogénicas más primitivas reciben el nombre de espermatogonias primitivas o células madre espermatogénicas, las cuales tienen una dotación cromosómica diploide ( $2n$ ) y están situadas en la porción más periférica de los túbulos seminíferos pegadas a su membrana basal, a partir de la pubertad algunas espermatogonias permanecen en reposo mientras que otras comienzan a proliferar por mitosis (6).

En el ser humano se reconocen tres tipos de espermatogonias; las espermatogonias de tipo A oscuras ( $2n$ ), son las más indiferenciadas de las células espermatogénicas, presentan un núcleo ovoide notablemente basófilo y granular; que se divide por mitosis dando lugar a células de su mismo tipo y a espermatogonias de tipo A claras ( $2n$ ). Las espermatogonias de tipo A claras son muy semejantes a las de tipo A oscuro, excepto que el núcleo es menos basófilo. Estas células al dividirse por mitosis dan lugar a las espermatogonias de tipo B. Las espermatogonias tipo B aumentan de tamaño presentan un núcleo esférico con heterocromatina en el margen y rodeando al nucléolo. Al dividirse por mitosis, las espermatogonias de tipo B dan origen a los espermatocitos primarios diploides  $2n$  y con fórmula cromosómica  $46XY$ . Estos espermatocitos primarios son células más voluminosas y representan la última generación de espermatogonias que se originan por mitosis (6).

Los espermatocitos primarios experimentan la meiosis en donde se observan cambios en la configuración de la cromatina en el núcleo después de la última división de la espermatogonia. Los espermatocitos primarios son las células más grandes del epitelio germinal (Figura 3) (7) y su meiosis inicia en leptoteno de la profase I en el compartimiento basal del epitelio germinal. Después de pasar la barrera de las células de Sertoli los espermatocitos alcanzan el compartimiento adluminal y continúan con cigoteno, paquiteno y diploteno. Durante la profase I se lleva a cabo la duplicación del ADN, la condensación de los cromosomas, el apareamiento de los cromosomas homólogos y los entrecruzamientos. Después de la primera división meiótica, las células se denominan espermatocitos secundarios, estas células ya no experimentan duplicación de ADN y se

dividen rápidamente para formar las espermatídes. Las dos divisiones celulares de cada espermatocito dan como resultado cuatro células haploides denominadas espermatídes, estas células experimentaran un proceso de diferenciación celular denominado espermiogénesis, que termina cuando la célula es liberada del epitelio germinal. En este momento se le denomina espermatozoide.

En las divisiones celulares, tanto mitosis como meiosis, no se presenta la citocinesis total, lo que deja puentes citoplasmáticos que forman sincicios, esto permite un desarrollo sincronizado de las células espermatogénicas, las cuales garantizan una producción constante de espermatozoides (5). Las conexiones sinciciales son mantenidas a través de las etapas de espermatogonia y espermatocitos y son disueltas en las etapas avanzadas del desarrollo de las espermatídes. En casos en que la espermatogénesis se encuentra disminuida, las espermatogonias tipo A oscuras se encuentran ausentes y no se presenta espermatogénesis en el epitelio germinal en donde solo se observan células de Sertoli.

## Espermatogénesis Humano

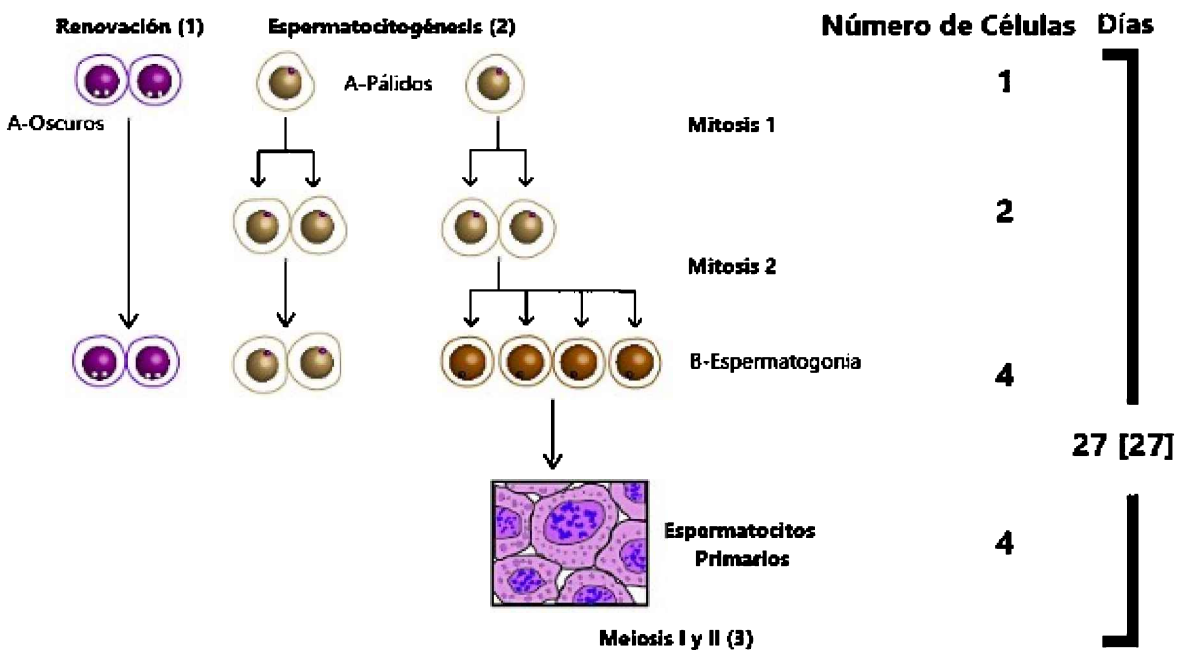


Figura 3. Imagen tomada de: Cerezo Parra, G. (Eds). (2022). *Manual para el Análisis del Semen Humano: Una Guía Práctica*.

### Espermiogénesis

Cada una de las espermatídes entran en un proceso de citodiferenciación denominado espermiogénesis, durante el cual van a sufrir una serie de cambios que los transforma en un espermatozoide haploide con una morfología característica. Este se lleva a cabo en tres fases:

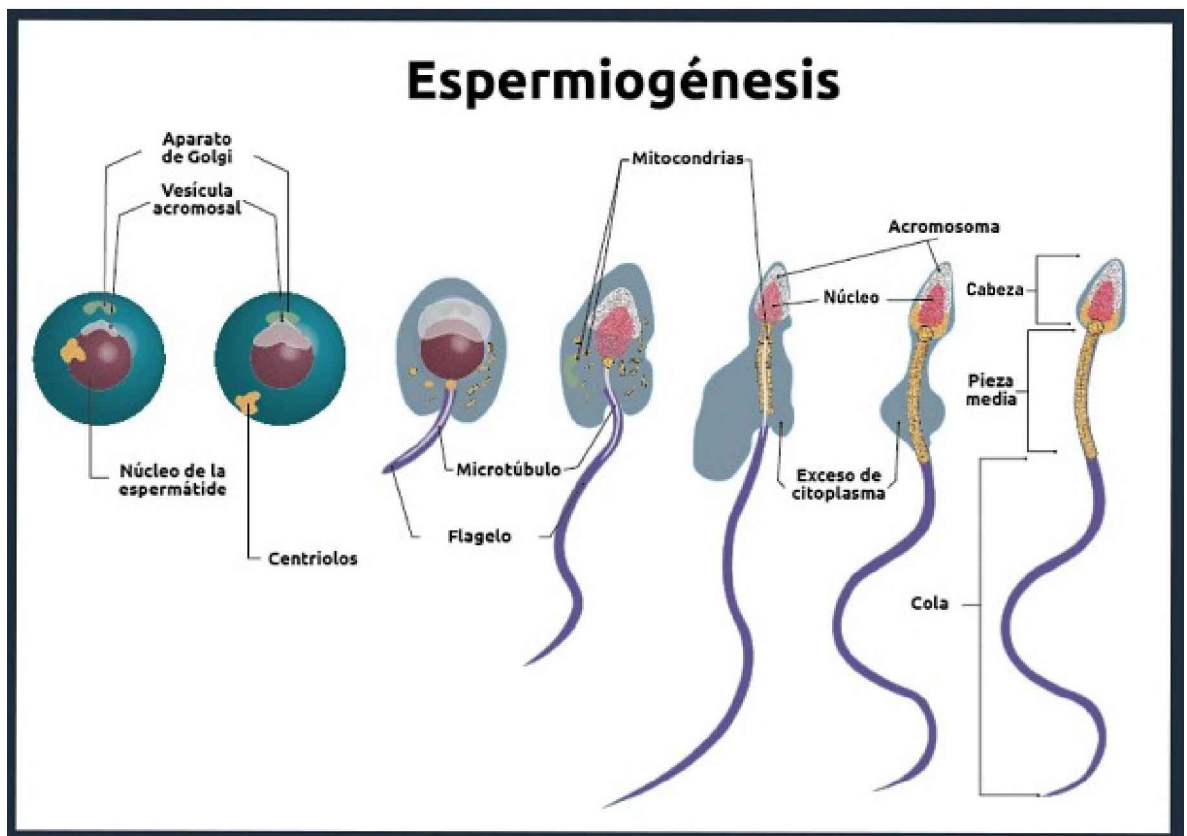
1) Condensación de la cromatina nuclear en aproximadamente un décimo del volumen de una espermatíde inmadura. Durante esta fase la espermatíde sufre una serie de cambios nucleares que incluyen la condensación de la cromatina y la migración del resto del citoplasma hacia la región que será en futuro la pieza intermedia y el flagelo. La condensación de la cromatina comienza con la formación del nucleosoma, que es la base estructural de la cromatina. El nucleosoma comprende una cadena de DNA que rodea un octámero o núcleo de histonas (H2A, H2B, H3, H4)<sub>2</sub> (8). Cada nucleosoma está conectado por un "linker" (histona H1) al DNA que le da a la cromatina de tipo somático la apariencia cuerdas en un collar (9). Esta organización de la cromatina desaparece y las histonas son reemplazadas por proteínas de transición que posteriormente serán reemplazadas por protaminas que son las responsables de la condensación final y la estabilización de la cromatina del

espermatozoide (10). La interacción del DNA con las protaminas es única, involucra el enrollamiento del DNA espermático en subunidades toroidales, también conocidas como “*doughnut loop*”. Al final de la espermiogénesis el núcleo del espermatozoide puede estar empaquetado en 50,000 estructuras toroidales (11). En esta etapa de condensación los gránulos de cromatina se transforman en un fino material homogéneo que llena de manera uniforme todo el núcleo espermático. La remodelación de un núcleo esférico a uno alargado y aplanado es llevada a cabo en esta fase y produce espermatozoides característicos de cada especie. Así, la espermatide se transforma finalmente en un espermatozoide funcionalmente inmaduro que será liberado en el túbulo seminífero (12).

2) Formación de la vesícula acrosomal a partir del aparato de Golgi y su unión al núcleo en la parte apical de la célula. En esta fase los gránulos post-acrosómicos que emergen del aparato de Golgi se fusionan para formar el pro-acrosoma el cual tiene la apariencia de una vesícula que se coloca sobre la parte anterior o apical del núcleo y que finalmente se transformará en acrosoma (12).

3) Desarrollo de la estructura del flagelo e implantación en el núcleo. Al mismo tiempo que se forma el pro-acrosoma, se inicia la formación del flagelo en el polo opuesto al de la adhesión de la vesícula acrosomal. El centríolo proximal se acerca más al núcleo y forma una base para la unión del flagelo con la cabeza (12).

De esta forma la espermatide desarrolla la configuración que la capacita para dejar el epitelio germinal y ser liberados a la luz de los túbulos seminíferos durante el proceso denominado espermiación. Normalmente un número de espermatides presenta malformaciones. Estas malformaciones pueden afectar solo el acrosoma, el núcleo o el flagelo o puede ser la combinación de ellas (13). Normalmente, un gran número de espermatidas presenta malformaciones que pueden afectar el acrosoma, el núcleo o el flagelo.



**Figura 4.** Imagen tomada de: Cerezo Parra, G. (Eds). (2022). *Manual para el Análisis del Semen Humano: Una Guía Práctica*. Diferenciación de un espermatozoide sin acrosoma. La condensación nuclear y el desarrollo de las estructuras del flagelo no se alteran. El acrosoma no establece contacto con el núcleo de la espermatide y permanece en el citoplasma de la célula de Sertoli.

## Espermiación

La liberación de las espermátidas maduras del epitelio germinal al lumen de los túbulos seminíferos es manejada por las células de Sertoli, como resultado de la cooperación de filamentos intermediarios y túbulos citoplasmáticos de las mismas células. Las espermátidas maduras cerrarán sus puentes citoplasmáticos se desconectarán del epitelio germinal y se liberarán, en este momento se les denomina espermatozoides. Al mismo tiempo, pequeñas partes de las espermátidas con gránulos de RNA, algunas mitocondrias, gotas de lípidos y fragmentos de membranas son liberadas, éstos últimos forman los llamados cuerpos residuales.

## Espermatozoide

La forma que adquiere el espermatozoide es adecuada para su transporte hacia el gameto femenino. Por ello, el núcleo es condensado, cubierto por un acrosoma para el establecimiento del contacto con el gameto femenino y se encuentra conectado a un flagelo para su movilidad progresiva.

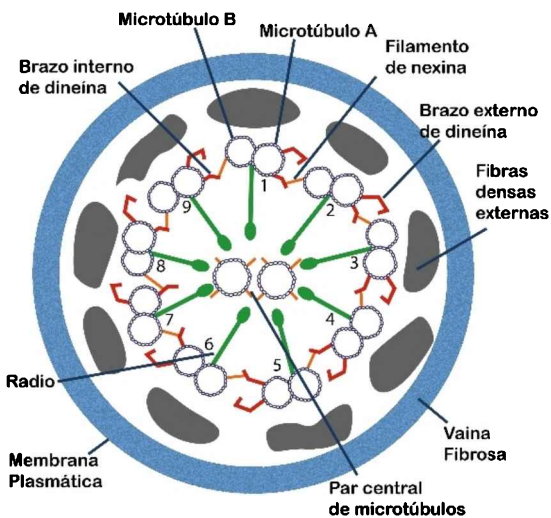
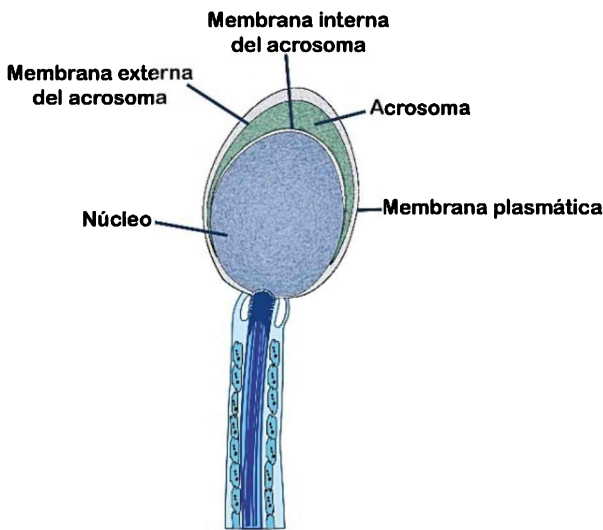
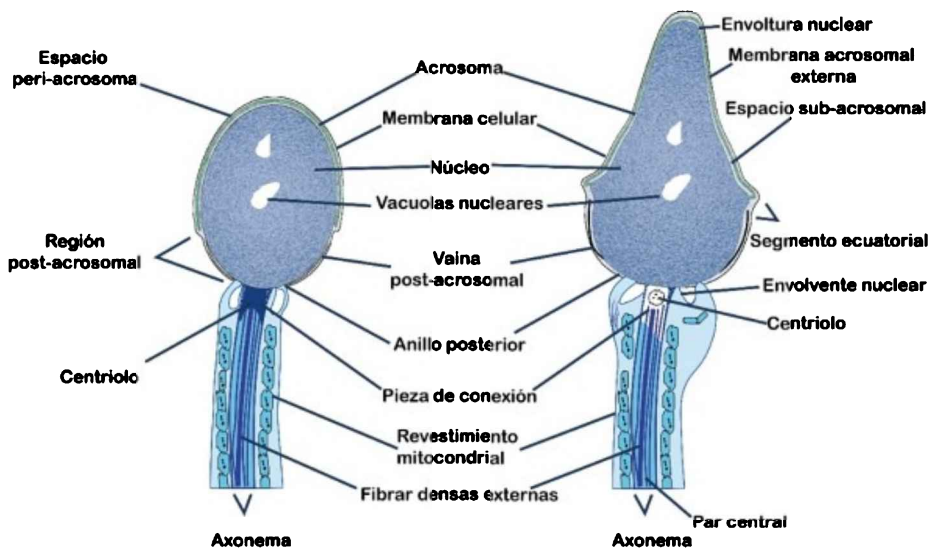
El espermatozoide es la célula de mamífero más diferenciada, mide 60  $\mu\text{m}$  de largo; está formado por la cabeza y el flagelo. El núcleo del espermatozoide abarca casi la totalidad del volumen de la cabeza, contiene el DNA de la célula y que al combinarse con el del gameto femenino formará el cigoto. El acrosoma es una vesícula secretora que se encuentra en la parte apical de la cabeza y que participará en la reacción acrosomal.

La cabeza es aplanada y mide de 4 - 5  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de ancho; está formada por el núcleo y el acrosoma. El núcleo del espermatozoide abarca casi la totalidad del volumen de la cabeza, contiene el DNA de la célula y que al combinarse con el del gameto femenino formará el cigoto. El acrosoma es una vesícula secretora que se encuentra en la parte apical de la cabeza y que participará en la reacción acrosomal.

El flagelo tiene tres regiones: cuello, pieza intermedia y pieza principal, el diámetro del flagelo es de 1 – 2  $\mu\text{m}$  y la longitud total de 60  $\mu\text{m}$ . El cuello es un estrechamiento que sigue a la cabeza y da origen al flagelo, este es corto y está formado por los centriolos y es el inicio de las fibras densas que forman el flagelo del espermatozoide. La pieza intermedia se extiende unos 5  $\mu\text{m}$ , es el extremo proximal del flagelo y contiene el axonema y un par central de microtúbulos más nueve periféricos. Externamente a las fibras, se encuentra la envoltura mitocondrial, constituida por mitocondrias alargadas, de crestas paralelas y matriz moderadamente densa, dispuestas formando una doble hélice. Hay escaso citoplasma entre la envoltura mitocondrial y la membrana plasmática que la limita externamente (Figura 5). La pieza principal sigue a la pieza intermedia y es la parte más larga del flagelo ( $\approx 45 \mu\text{m}$ ). En ella, la envoltura mitocondrial ha sido sustituida por la envoltura fibrosa. La configuración de las fibras densas varía de la pieza intermedia a la pieza principal. A medida que avanzan hacia el extremo caudal del flagelo, las fibras densas son más finas (5).

La morfología del espermatozoide humano se puede observar en la figura 5 (14). La capacidad de moverse progresivamente la adquiere durante su transporte a través de los ductos epididimales y al mismo tiempo se lleva a cabo la maduración de las membranas celulares. La movilidad de los espermatozoides depende principalmente del normal desarrollo de la estructura denominada axonema (por ejemplo, los dobletes de microtúbulos, brazos de la proteína dineína, etc), la presencia de la envoltura de mitocondrias en la pieza media y la implantación del flagelo en el núcleo por ambos centriolos.





**Figura 5.** Espermatozoide humano. Aspecto de un espermatozoide en microscopia de luz, (2) Imagen virtual de un espermatozoide que representa el acrosoma, el núcleo y la membrana nuclear; la envoltura mitocondrial de la pieza principal del flagelo.

Una vez formado el espermatozoide en el aparato reproductor, su objetivo principal consiste en transferir el ADN haploide masculino al ADN femenino en el citoplasma de un ovocito a través de una serie de eventos que implican su desplazamiento a lo largo del tracto genital femenino y su capacidad de fecundar al ovocito (15).

## **Fisiología del sistema reproductor masculino**

En el feto masculino, los testículos se desarrollan cerca de los riñones y justo antes del nacimiento descienden al escroto. La testosterona es producida en los testículos, estimula la producción de espermatozoides y da las características sexuales secundarias al inicio de la pubertad.

Los testículos presentan dos funciones: 1) endocrinas (producción de hormonas sexuales) y 2) génesis y maduración de los gametos masculinos o espermatozoides.

Las hormonas sexuales masculinas desarrollan por primera vez su efecto en la primera etapa embrionaria para la diferenciación sexual, hacia la séptima semana de gestación se libera una pequeña cantidad de andrógenos, que inhibe la formación o el desarrollo de ese embrión en un ser femenino. Si no se produjera esta liberación, aparecería el pseudohermafroditismo, que es un trastorno en la diferenciación sexual en donde los testículos aparecerán en el abdomen y los individuos poseen genitales externos femeninos.

La siguiente fase en la producción de hormonas, aparece en la pubertad, desaparece un freno hipotalámico y empiezan a producirse los ciclos hipotalámicos-hipofisarios (maduración sexual). En la maduración, aparece la formación del semen por la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) que actúa sobre las espermatogonias presentes en los túbulos seminíferos, encargados de la producción y maduración de los espermatozoides.

La regulación de la función testicular es mediada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo mediante un mecanismo denominado *feed-back*. La producción de espermatozoides y la secreción de testosterona por el testículo son dependientes de la estimulación por las gonadotropinas de la pituitaria: la FSH y la hormona luteinizante (LH), que son secretadas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH). La testosterona (T), que es esencial para la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, es secretada por las células de Leydig adultas bajo la estimulación de la LH. La testosterona actúa vía receptores de andrógenos (ARs) en las células de Sertoli, Leydig y peritubulares, en lugar de actuar sobre las células germinales (16).

La FSH actúa vía receptores de superficie acoplados a la proteína G localizados exclusivamente en las células de Sertoli. La FSH presenta un papel clave en el desarrollo del testículo inmaduro, particularmente al controlar la proliferación de las células de Sertoli (17). Además, la espermatogénesis en humano es cuantitativamente dependiente de FSH. Las secreciones de FSH son reguladas por una alimentación negativa de la hormona testicular inhibina B y por testosterona o por el estradiol (18).

Recientemente se ha demostrado que las células de Leydig poseen propiedades neuroendocrinas además de sus funciones endocrinas. Existe evidencia de que las células de Leydig expresan serotonina, enzimas que sintetizan catecolamina, diferentes antígenos característicos de las células nerviosas, también como neurohormonas y sus receptores, neuropéptidos, moléculas de adhesión celular, componentes del sistema NO/cGMP, componentes del sistema renina/angiotensina, proteínas de los neurofilamentos, proteínas de las vesículas sinápticas y de almacenamiento y numerosos factores de crecimiento y sus receptores. Además, las células de Leydig poseen antígenos característicos de las células gliales tales como astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. Todos estos hallazgos caracterizan a las células de Leydig como células neuroendocrinas post-mitosis, que no se dividen y con propiedades pluripotenciales. Algunos de los antígenos neuronales (por ejemplo, la sustancia P, NO, péptido natriurético tipo C, catecolamina, IGF1, TGF- $\beta$ , PDGF) están involucrados en los mecanismos de regulación autocrino y/o paracrino del testículo (19) tales como producción de testosterona, mantenimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, la comunicación local entre las células somáticas del órgano (Células de Leydig, células peritubulares, células de Sertoli), la regulación del flujo sanguíneo en los vasos del testículo y la permeabilidad de hormonas y sustancias nutritivas, también como la contractibilidad de los túbulos seminíferos y de la túnica albugínea. Las células de Leydig ahora son consideradas una parte del sistema neuroendocrino (19, 20, 21).

Diferentes aspectos de la organización y función de las células de Leydig como degeneración, hiperplasia o tumores degenerativos comúnmente aparecen a lo largo de las alteraciones de la espermatogénesis. El número de células de Leydig no necesariamente

correlacionan con la producción de la hormona. Se ha demostrado por investigaciones inmunohistoquímicas que en los casos de un incremento en el número de células de Leydig la producción de testosterona se lleva a cabo en muy pocas de estas células (22).

## Agradecimientos

Agradecemos a la Química Ana María Medina de la Rosa por su gran apoyo en el diseño de las imágenes de este capítulo.

## Referencias

1. Hoffman BL, Schorge JO, Halvorson L M, Hamid CA, Corton MM y Schaffer JI. Valoración de la pareja estéril. In *Williams Ginecología, 4e*. McGraw-Hill Education. 2020.
2. Roosen-Runge EC, Holstein AF. The human rete testis. *Cell Tissue Reserch*. 1978, 189:409-433.
3. Russell LD, Griswold MD: *The Sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater FL; 1993.
4. Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res*. 1990. 262:253-261.
5. Bizarro NP, Acevedo NS y Herrera EM. Aparato reproductor masculino. In D. T. I. Fortoul van der Goes (Ed.), *Histología y biología celular, 3e*. McGraw-Hill Education, 2017.
6. Serna, N. L. Gametogénesis y espermatogénesis. In *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Education. 2015.
7. Cerezo PG. Manual para el análisis del semen humano: Una guía práctica. 2022.
8. Kornberg RD. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974, 184:868-871
9. Wolffe AP. Histone H1. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997, 29:1463-1466.
10. Zhao M, Shirley CR, Yu E, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NHA, Weil MM, Russel LD, Behringer RR, Meistrich ML. Targeted Disruption of the Transition Protein 2 Gene Affects Sperm Chromatin Structure and Reduces Fertility in Mice. *Mol Cell Biol*. 2001, 21:7243-7255.
11. Balhorn R, Brewer L, Corzett M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev*. 2000, 56(2 Suppl):230-234.
12. Arteaga MM, García PI. En: *Embriología humana y biología del desarrollo*. Medica Panamericana Eds. 2017.
13. Holstein AF, Roosen-Runge EC, Schirren C: *Illustrated pathology of human spermatogenesis*. Berlin: Grosse; 1988, 10.
14. Roosen-Runge EC. In: *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge: Cambridge University Press. 1977.
15. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, y Saéz FJ. Gametogénesis y fecundación. In *Biología celular y molecular, 4e*. McGraw-Hill Education. 2017.
16. Johnston DS, Russell LD, Friel PJ, Griswold MD. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* 2001, 142:2405-2408.

17. Orth JM. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing LL, eds. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. New York: Oxford University Press, 1993; 3–43.
18. Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF Jr. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86:53–58.
19. Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 1993, 271:429–439.
20. Davidoff MS, Middendorff R, Holstein AF. Dual nature of Leydig cells of the human testis. *Biol Med Rev* 1996, 6:11–41.
21. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol*. 2004, 167:935–44.
22. Holstein AF, Schulze W and Davidoff M: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003, 1:107–113.

# INTRODUCCIÓN A LA ESPERMATOLOGÍA

Georgios Voulgaridis

Presidente de la Asociación Helénica de Espermatología, Atenas, Grecia.

Autor Corresponsal: Georgios Voulgaridis. 13, Andrea Syggrou Av.; 117 43, Athens; (GR) Greece, Tel. +30 210 9227 515. Correo electrónico: [has@spermatology.com](mailto:has@spermatology.com)

## Objetivo

Revisar nuestro conocimiento y metodología en el estudio del semen humano con el objetivo de aumentar la conciencia sobre la salud del hombre a nivel mundial.

El semen es un material que la mitad del mundo produce, la otra mitad usa, pero no sabemos mucho al respecto. Todos entendemos de qué se trata la Espermatología, a pesar de que algunos especialistas en Reproducción Humana suelen malinterpretar su relación con la Andrología. Ellos sólo están interesados en la capacidad de fertilización de los espermatozoides ignorando que el semen en realidad puede proporcionarnos información sobre el estado de salud del tracto genital masculino. Los hombres rara vez presentan síntomas cuando su tracto genital no está sano. Es por esto por lo que el chequeo andrológico preventivo periódico, que necesariamente incluirá un análisis de semen, es aún más importante para ellos que el Papanicolaou para mujeres. Por lo tanto, es fundamental darse cuenta de la necesidad de crear, en todo el mundo, una red confiable de laboratorios de Espermatología especializados que brinden acceso equitativo a la atención médica de calidad adecuada.

## Definiciones

*Espermatología* es la rama de la Biología que se ocupa del estudio (del griego: -λογία, -logia, de la raíz λογ-; variante ablativa de λεγ-, λέγειν, hablar; el sustantivo en -λογία denota el departamento de conocimiento o estudio) del semen (del griego: σπέρμα, spérma, semen; genitivo σπέρματος, spérmatos, del semen), en todos los niveles de organización desde la célula hasta el organismo.

*Espermatólogo* es el científico graduado en Ciencias Biológicas y que se ocupa del estudio del semen.

*Laboratorio de espermatología* es un laboratorio dirigido por un científico graduado en Ciencias Biológicas y que se ocupa del estudio del semen.

*Andrología* es la rama de la Medicina que se ocupa del estudio del hombre (del griego: άνδρας, andras, hombre (masculino); genitivo άνδρός, andros, del hombre (masculino)) y es una subespecialidad clínica (en algunos países una especialización) de Urología.

## Concienciación ineficiente sobre la salud masculina

La conciencia ineficiente sobre la Salud del Hombre a nivel mundial expone a hombres, mujeres y niños a un riesgo significativo de sufrir una situación que amenaza su calidad de vida, lo que también puede conducir a una condición que amenaza la vida.

Las irregularidades en el ciclo menstrual notifican a una mujer sobre un mal funcionamiento de sus ovarios. Además, las infecciones genitales suelen ser sintomáticas en las mujeres, que de todos modos consultan regularmente a su ginecólogo. De hecho, hace varios años que a las mujeres se les enseña a someterse a un chequeo preventivo que incluye la prueba de Papanicolaou.

Los hombres apenas pueden percibir una infección de próstata o un mal funcionamiento de sus testículos. A pesar de la falta de síntomas, a los hombres no se les ha enseñado a consultar a un urólogo de manera preventiva ya en la adolescencia. Los Sistemas Nacionales de Salud promueven el chequeo urológico preventivo solo para hombres mayores de 50 años. Desafortunadamente, a esa edad la cronicidad de una infección urogenital asintomática ha llevado a daños irreversibles.

Dado que los hombres jóvenes no suelen consultar a un urólogo, cuando se trata de fertilidad, siempre es la mujer quien debe consultar a su ginecólogo. En ausencia de su urólogo, es el ginecólogo el que solicita un análisis de semen. Independientemente de que un varicocele, un tumor testicular o un tracto urogenital puedan afectar o incluso ser la causa de un semen "débil", los ginecólogos, ignorando este hecho, utilizan los valores de referencia de la OMS para decidir si aconsejar la inseminación intrauterina (IIU) o fecundación in vitro (FIV). Como resultado, los hombres "subfértiles" quedan mal diagnosticados, sin tratamiento y, por lo tanto, su estado de salud empeora.

### **Si bien la reproducción en humanos se logra mediante la "colaboración" de ambos sexos, esta colaboración no se cumple en el campo de la Reproducción Asistida**

Los ginecólogos no suelen aconsejar a los hombres subfértiles que deben consultar a un urólogo. La OMS no es una excepción. Hace dos años, la Asociación Helénica de Espermatología (HAS) comunicó al Departamento de Salud e Investigación Sexual y Reproductiva (SRH) de la OMS la publicación de una investigación que trata sobre un análisis de semen que evalúa el tracto genital masculino y la promoción de un chequeo preventivo de los varones en la adolescencia (1). Inesperadamente, esa comunicación fue respondida por un ginecólogo, quien también pidió la opinión de otros dos ginecólogos. Aunque el H.A.S. apoya la cooperación interdisciplinaria, sostiene que los urólogos, no los ginecólogos, son los competentes para tratar cualquier cuestión relativa a la salud de un hombre, incluida su capacidad fecundante. Las respuestas del departamento de SSR de la OMS fueron decepcionantes. Se admitió que el departamento de la OMS dedicado a la Reproducción Humana carece de urólogos. El departamento también sugirió contactar a las asociaciones ginecológicas IPPF y ESHRE para expertos en temas relacionados con la Salud del Hombre ignorando que la ESHRE, una organización formada por ginecólogos para los intereses de los ginecólogos, a pesar de que dice tener un grupo de Andrología (SIGA), está dirigida por ginecólogos; mientras que la IPPF también es una organización formada por ginecólogos, pero los ginecólogos de esta última están interesados principalmente en la anticoncepción más que en la concepción.

### **El departamento de Salud e Investigación Sexual y Reproductiva de la OMS es en realidad un departamento de Salud de la Mujer**

El departamento de SSR está dividido en siete Unidades técnicas, todas ellas relacionadas con la Salud de la Mujer. Irónicamente, a pesar de que este departamento afirmó que el título recientemente atribuido a este departamento refleja con mayor precisión el trabajo que realiza su personal (<https://www.who.int/reproductivehealth/news/msg-from-RHR-HRP/en/>), el la biografía del mismo personal demuestra que todos se enfocan en la salud de la mujer. Incluso los valores de referencia de la OMS para la evaluación del semen humano se refieren a la capacidad de lograr un embarazo, en lugar de referirse al estado de salud del aparato reproductor masculino.

Sin duda, el hecho de que la Organización Mundial de la Salud carezca de urólogos, urólogos-andrólogos y biólogos-espermatólogos es inaceptable. Estos son los científicos competentes para tratar los temas relacionados con la salud de los hombres, es decir, la salud de la mitad de la población mundial humana. La necesidad de racionalizar la organización y funcionalidad del departamento de SSR es por lo tanto obvia y obligatoria. Un departamento dedicado a la salud sexual y reproductiva deberá brindar servicios iguales a mujeres y hombres. Estudiará la salud sexual y reproductiva de las mujeres por igual que la salud sexual y reproductiva de los hombres. Este servicio estará, por tanto, dirigido a partes iguales por

ginecólogos, endocrinólogos, urólogos-andrólogos, biólogos-embriólogos, biólogos-espermatólogos y psicólogos.

### **Un departamento de Salud Masculina en la organización de la OMS es obligatorio**

Como ya se mencionó anteriormente, la falta de educación en el chequeo preventivo del tracto genital masculino, la falta de síntomas en los hombres y el hecho de que generalmente se establece que los ginecólogos son competentes y suficientes por sí solos para tratar los problemas de infertilidad de una pareja, amenaza la salud y la calidad de vida de los hombres. Se hace entonces evidente que el chequeo preventivo de los hombres ya en la adolescencia despertará la preocupación pública.

Las decisiones de la OMS son fundamentales para sincronizar las campañas internacionales y los programas nacionales de salud con este fin. La conciencia centralizada es fundamental para la planificación estratégica de las directrices internacionalmente aceptadas. En consecuencia, es obligatoria la provisión de un departamento dedicado a la Salud del Hombre en la Sede de la OMS. Este servicio estará dirigido por urólogos, urólogos-andrólogos y biólogos-espermatólogos. Llevará a cabo sus asuntos con independencia del departamento de SSR, ya que los problemas de salud relacionados con el aparato genital masculino no necesariamente se refieren a la reproducción.

### **La mala interpretación y el mal uso de las recomendaciones de la OMS no es culpa de los médicos**

La Organización Mundial de la Salud admite que el análisis de semen siguiendo sus valores de referencia y las metodologías de la OMS no se utilizará con fines de diagnóstico (2) (3). De hecho, la explicación de que la OMS que cita en el prefacio de la 4ª edición del manual para la valoración del semen humano es característica: *'Cabe señalar que no es objeto del manual establecer los valores seminales mínimos o más bajos compatibles con la consecución de un embarazo, in vivo o in vitro. ... Los rangos de referencia para el semen humano presentan algunas dificultades conceptuales. La relación entre la calidad del semen y la fertilidad se complica por muchos otros factores, incluida la fertilidad femenina. Por lo tanto, los hombres con semen anormal aún pueden ser fértiles, mientras que los hombres con una calidad de semen mejor que el promedio producen embarazos a tasas más altas que el promedio. ... Finalmente, se debe enfatizar que el objetivo principal de este manual es fomentar el uso de procedimientos estándar para establecer valores de referencia (anteriormente llamados valores "normales") para el análisis de semen.*

La OMS admite también, que a pesar de que los valores de referencia se estimaron a partir de datos recopilados de diferentes laboratorios, estos laboratorios no seguían las mismas metodologías para la evaluación de los parámetros seminales. No estaban evaluando los mismos parámetros, a pesar de que afirmaban que estaban siguiendo las recomendaciones del manual de la OMS: *"La falta de detalle en ediciones anteriores ha significado que algunos laboratorios han preferido usar métodos descritos en otros lugares, o han desarrollado sus propias versiones de métodos, sin dejar de afirmar que realizan análisis de semen de acuerdo con el manual de la OMS"* (Organización Mundial de la Salud, 2010, cap.1 par.1.1, pag.1). De hecho, los valores de referencia de algunos parámetros se estimaron utilizando 400 análisis y algunos otros utilizando los datos de 1900 análisis. Desde el punto de vista de un estadístico, el proceso antes mencionado utilizado para la determinación de los valores de referencia hace que estos valores sean, sin duda, poco fiables. Además, la OMS insta a los laboratorios a determinar sus propios valores de referencia: *"Es preferible que cada laboratorio determine sus propios rangos de referencia para cada variable"* (2).

Los parámetros fisicoquímicos y los tipos de anomalías morfológicas no han despertado suficientemente la preocupación de los interesados en la capacidad fecundante del semen. Como resultado, están mal descritos en el manual de la OMS y rara vez se reportan en un análisis de semen, especialmente cuando este análisis se realiza en un laboratorio no especializado o en una clínica de FIV. Incluso cuando estos parámetros se evalúan e informan en el análisis de semen, la mayoría de los expertos no están interesados en su valor diagnóstico. La OMS revela su subestimación de las características fisicoquímicas, una vez más, en la 6ª edición de su manual. A pesar de que el equipo editorial acusó la *"falta de detalle en manuales anteriores"* por la discordancia entre laboratorios, los autores de la última edición lo volvieron a hacer. Lamentablemente, el equipo editorial confunde varias veces la viscosidad con la licuefacción y

viceversa (4). Además, no es de extrañar que el pH seminal, un indicador muy fuerte de inflamación, esté absolutamente desacreditado. Irónicamente, la presencia de inflamación es fundamental en el desarrollo de especies reactivas de oxígeno, lo que, por el contrario, atrajo el interés del último equipo editorial. Dedicaron el tercer y cuarto capítulo a los “exámenes” sin valor diagnóstico probado. Después de todo, el equipo editorial está interesado en la capacidad de fertilización de los espermatozoides, no en el estado de salud del tracto genital masculino.

Además, una vez más, la OMS dudas sobre la ortodoxia de los métodos descritos en su manual: *“Los métodos descritos aquí pretenden ser una guía para mejorar la calidad del análisis del semen y la comparabilidad de los resultados. No necesariamente deben ser tomados como obligatorios por los organismos de acreditación de laboratorios locales, nacionales o globales”* (3). Aunque la OMS establece claramente las limitaciones de los valores de referencia, estos valores se utilizan incorrectamente con fines diagnósticos en la práctica clínica (World Health Organization, 2010, ch.1 par.1.3, pag.1). Los ginecólogos usan estos valores para decidir si el semen de alguien es fértil o no. Más preocupante aún es el hecho de que estos valores están siendo mal utilizados por los urólogos para decidir si un varicocele debe ser operado quirúrgicamente o no.

Como la OMS admite en el citado extracto, los valores de referencia dependen de factores exógenos, como la ‘fecundidad femenina’. Obviamente, los valores de referencia que dependen de factores exógenos no son apropiados para la evaluación de una condición intrínseca, especialmente para la evaluación de la salud de un hombre. Por lo tanto, un análisis de semen se referirá a factores endógenos. Además, para determinar los intervalos de confianza de los valores fisiológicos de cada uno de los parámetros seminales, la evaluación se realizará con referencia a la función fisiológica del aparato genital masculino.

Por último, pero no menos importante, como ya se mencionó, varios estudios verificaron que los criterios y metodologías de la OMS no se implementan ni desde los laboratorios no especializados ni desde las clínicas de FIV, a pesar de que afirman realizar análisis de semen según el manual de la OMS.

Aunque la OMS consciente de la interpretación errónea y el mal uso de sus recomendaciones antes mencionado, la Organización insiste en editar manuales que traten sobre la capacidad fecundante del semen y en contratar a ginecólogos que se dicen expertos en Andrología y Espermatología en la redacción del manual que trata sobre el estudio del semen, un producto del aparato genital masculino.

### **El análisis de semen deberá ser realizado únicamente por personas con título en Ciencias Biológicas y con formación especial en Espermatología**

Un estudio reciente, en Grecia, que incluyó 139 análisis de semen de 67 laboratorios, de los cuales eran 39 de Microbiología, 2 de Biología Molecular, 23 de A.R.T. laboratorios y 3 laboratorios de Espermatología, mostró que ninguno de los laboratorios de Microbiología sigue las recomendaciones de la OMS, que los análisis realizados en las clínicas de FIV (laboratorios de TRA) tienen omisiones importantes y que solo los laboratorios de Espermatología realizan un análisis de semen según las recomendaciones de la OMS (Voulgaridis, 2018, par.5, pag.10-13 y anexo I, pag. 42-50). Varios estudios en otros países y más precisamente en Polonia, Reino Unido, España, Noruega, Alemania, EE. laboratorios especializados es la falta de equipo adecuado y capacitación, mientras que para las clínicas de FIV es la falta de interés (1, 5, 6, 7, 8, 9).

Después de todo, dado que la Espermatología es una rama de la Biología, solo una persona con un título en Ciencias Biológicas y una formación especial en Espermatología es competente para realizar estudios de investigación en Espermatología y realizar un análisis de semen.

### **El problema radica en que el análisis de semen siempre se ha considerado como una prueba de fertilidad**

De hecho, los ginecólogos (y, por lo tanto, las clínicas de FIV, que administran) solo están interesados en si hay suficientes espermatozoides para la inseminación intrauterina, o solo unos pocos para la fertilización in vitro. Solo están interesados en lograr un embarazo independientemente del hecho de que, el pH alto indica la presencia de una infección del tracto urogenital. No es el estado de salud de su pareja lo que le interesa al ginecólogo, ni es competente para tratarlo. Irónicamente, las infecciones del tracto urogenital involucran a ambos miembros de la pareja y pueden afectar negativamente el resultado del tratamiento de FIV, el embarazo y el feto. Además, en la 4ª edición del manual para la valoración del semen, la OMS



expresa su preocupación por la creciente incidencia de las patologías del tracto urogenital, principalmente del tumor testicular. Este es un hallazgo que despierta la preocupación del público.

Todos estamos de acuerdo en que los ginecólogos no son competentes para diagnosticar un varicocele, un cáncer de próstata, una epididimitis o un tumor testicular. A pesar de que estas patologías son solo algunas de las tantas que pueden afectar o incluso ser la causa de un semen "débil", es comúnmente aceptable que un ginecólogo interprete un análisis de semen para evaluar la capacidad fecundante del examinado, ignorando su estado general de salud. Por ello, se aconseja a las parejas que se sometan a una técnica de reproducción médicamente asistida independientemente de que el varón haya consultado o no previamente a un urólogo. Después de todo, los valores de referencia de la OMS se definen sobre la base de la potencialidad de lograr un embarazo.

Además, los ginecólogos que afirman ser expertos en Andrología sostienen que son competentes para tratar con semen humano. Por lo tanto, no es de extrañar que en el equipo editorial de los manuales de la OMS haya muchos ginecólogos. Mucho más que los urólogos-andrólogos y los biólogos-espermatólogos que cualquiera esperaría encontrar en el equipo editorial de un libro de texto sobre el ciclo menstrual. Recordando las definiciones del primer párrafo, resulta obvio que el término correcto para un laboratorio que se ocupa del análisis de semen es el término "laboratorio de espermatología". Por lo tanto, el biólogo-espermatólogo analiza el semen y el urólogo-andrólogo combina la información proporcionada por el análisis del semen con otros hallazgos de laboratorio y clínicos, para poder hacer el diagnóstico. Colaboran, pero provienen de distinguidas escuelas de Ciencias.

El hecho de que los hombres jóvenes no acostumbren a consultar a un urólogo, es la razón por la cual, cuando se trata de fertilidad, siempre es la mujer la que consulta a su ginecólogo. En ausencia de su urólogo, es su ginecólogo para pedir un análisis de semen. Como resultado, esta prueba se convirtió en la herramienta del ginecólogo en el camino para lograr un embarazo. Dado que se les permitió tratar la subfertilidad masculina, afirman ser expertos en Andrología. Dado que administran clínicas de fertilidad, generalmente sin urólogos, se les permitió nombrar como "laboratorios de andrología" a sus bancos que realizan análisis de semen. Sin embargo, lo anterior no hace que los ginecólogos sean graduados en Biología.

Indebidamente, la confusión entre estas dos ramas de la ciencia es promovida en el manual de la OMS, que se refiere al término erróneo "laboratorios de andrología" en lugar del término correcto "laboratorios de espermatología".

Un análisis de semen no se trata solo de un "recuento de espermatozoides". Considerando que el líquido seminal es producido por las glándulas accesorias, se hace evidente que las características fisicoquímicas no son menos importantes en la evaluación del estado de salud del aparato genital masculino. Por lo tanto, un análisis de semen es una herramienta esencial para el urólogo en la evaluación de la salud de los hombres. La OMS. tiene que considerar seriamente la revisión de la evaluación del semen humano bajo el prisma de la salud genital masculina.

### **El análisis que sigue las recomendaciones de la OMS para la evaluación de la capacidad fecundante del semen está comprometiendo la Salud Pública (lo que va en contra de los principios básicos de la Constitución de la OMS)**

A pesar de que la OMS está tratando de estandarizar un conjunto de procedimientos comúnmente aceptados para la evaluación de la capacidad fecundante del semen, los laboratorios no suelen seguir las recomendaciones del manual de la OMS. Aunque la OMS ha explicado exhaustivamente por qué los valores de referencia no deben utilizarse con fines de diagnóstico, los médicos utilizan estos valores para diagnosticar la infertilidad o decidir operar quirúrgicamente un varicocele. De hecho, los valores de referencia suelen malinterpretarse como valores fisiológicos del semen. El hecho de que el análisis de semen se refiera a la fertilidad, hizo que los hombres consultaran a un ginecólogo por la función de sus testículos. A pesar de que los ginecólogos no son competentes para diagnosticar, por ejemplo, un tumor testicular, 'tratan' el semen 'débil' mediante fertilización in vitro sin recomendar al examinado que consulte primero a un urólogo. De esta manera, el examinado permanece sin tratamiento y su pareja se somete a una fertilización in vitro debido a un diagnóstico erróneo. Los hechos mencionados son suficientes para sustentar que el análisis que evalúa la capacidad fecundante del semen puede considerarse racionalmente comprometedor para la salud de hombres y mujeres.

## **Hablemos de los espermatozoides... adecuadamente**

Las cuestiones antes mencionadas dejan en claro que la ineficiente conciencia sobre la salud de los hombres se convirtió en la razón por la cual el semen era solo el material que los ginecólogos usaban para embarazar a sus clientas. También es obvio que necesitamos revisar los criterios utilizados para la evaluación del semen (humano). Necesitamos hacer que los hombres consulten a su urólogo de forma preventiva, de forma regular. Los urólogos deben estar capacitados en Andrología y el análisis del semen debe ser capaz de describir el estado de salud del aparato genital masculino. Por último, pero no menos importante, un sistema de auditoría eficaz y confiable deberá garantizar que la evaluación, el análisis, el examen y el procesamiento del semen humano se realicen de manera imparcial y con competencia, capacidad y adecuación documentadas.

### **Andro-test: el análisis de semen que evalúa la salud de los hombres**

Un análisis de semen que puede decirle a un hombre si su tracto genital está sano se desarrolló después de ocho años de investigación que incluyó a 1197 examinados. Cada análisis de semen se realizó utilizando estrictos criterios estandarizados con el fin de minimizar los factores que pudieran comprometer la fiabilidad de las conclusiones deducidas. El estudio observacional fue diseñado por bioestadísticos y la valoración de cada muestra de semen fue realizada en un laboratorio de Espermatología, por biólogos con especial formación en Espermatología, siguiendo las recomendaciones de los manuales de la OMS (4ª y 5ª edición). El estudio se realizó sobre datos de muestras que ya habían sido evaluadas, con el fin de evitar la parcialidad del técnico que evalúa la muestra. Solo se incluyó en el estudio el análisis de la primera visita de cada examinado, para evitar sesgos por tratamiento incompleto en el siguiente análisis del mismo examinado.

Cada muestra del estudio se había sometido a un examen microbiológico completo que se realizó desde un laboratorio independiente. El análisis estadístico investigó la relación entre los parámetros del semen y el estado de salud del aparato genital masculino. Desafortunadamente, debido a la alta prevalencia de infecciones del tracto urogenital (87,30%) en las muestras estudiadas, este análisis estadístico no pudo deducir conclusiones significativas sobre otras patologías del tracto genital masculino. Por lo tanto, los valores fisiológicos determinados se refieren principalmente a la presencia de infecciones del tracto urogenital. Sin embargo, es importante señalar que este estudio utilizó únicamente criterios endógenos para la determinación de los valores fisiológicos de cada parámetro del semen humano.

La determinación de los valores fisiológicos condujo a la descripción de los Criterios de SpermLab y el análisis de semen para Men's Health. Además, los valores fisiológicos de este análisis de semen se relacionaron con condiciones patológicas específicas del tracto genital masculino y los riesgos relativos (odds ratio) para cada parámetro (ver tabla 8.3.2 p.38, Voulgaridis et al., 2018, <https://doi.org/10.30551/ijs.v1i1.1>) se determinaron con un grado de significación muy alto (valor  $p < 0,05$ ). Las características fisicoquímicas y los tipos de anomalías morfológicas resultaron particularmente importantes en la evaluación del estado de salud del aparato genital masculino. El nuevo enfoque restableció el reconocimiento que siempre merecieron, pues se demuestra que están fuertemente relacionados con la presencia de una condición patológica. Se demostró que la importancia de los parámetros fisicoquímicos del semen es fundamental en el desarrollo del Autoexamen del Semen y el Chequeo Andrológico Anual. En las conclusiones de la publicación se describen los factores que limitaron las potencialidades del estudio y el autor alienta la realización de estudios en individuos con antecedentes andrológicos conocidos, que se espera perfeccionen los resultados y mejoren nuestro conocimiento en salud masculina.

Un estudio muy reciente (10) demuestra la importancia del análisis de semen siguiendo los Criterios de SpermLab y del Autoexamen de Semen en el chequeo preventivo de los hombres y el procedimiento diagnóstico del examen andrológico. En este último estudio se comprueba que en casi 9 de cada 10 casos (87,68%), si al menos uno de los parámetros seminales está fuera de los valores fisiológicos, se detecta un microorganismo en la muestra de semen en examen. También está comprobado que en el 98,76% de las muestras donde se detectó un microorganismo, al menos uno de los parámetros seminales estuvo fuera de los valores fisiológicos.

Una infección del tracto urogenital en los hombres afecta primero a los parámetros fisicoquímicos del semen, ya que describen la función de la próstata y los túbulos seminíferos, que se encuentran en la parte anterior del tracto genital. El estudio que condujo a la descripción de andro-test confirmó que, en presencia de una infección del tracto urogenital, al menos uno de estos parámetros del semen está fuera de los valores fisiológicos. Es por esto por lo que cuanto

menos de estos parámetros sean evaluados, menos probable es sospechar la presencia de un microorganismo en la muestra de semen en examen.

El andro-test permitió el desarrollo del 'Autoexamen del Semen', un método que permite a cada hombre, sin necesidad de entrenamiento especial o equipo de laboratorio, ni ningún costo, controlar la salud de su tracto genital regularmente, con comodidad y discreción de su espacio personal. Con este autoexamen se espera sensibilizar a los hombres de todo el mundo sobre la importancia del chequeo andrológico preventivo. Para garantizar que este chequeo preventivo se realizará de forma estandarizada, se le da el nombre de "*Chequeo Andrológico Anual*".

El Autoexamen de Semen consiste en la evaluación de cuatro características del semen que cada hombre puede evaluar en la comodidad de su espacio personal, sin ningún laboratorio o equipo especializado. Tres de estas características, el volumen, la licuefacción y la viscosidad, valoran el estado de salud de las glándulas accesorias (principalmente la próstata y los túbulos seminíferos) y sus valores anormales se relacionan con una infección del tracto genital (odds ratio=1,60 y p-valor=0,040). La cuarta característica, el color del semen, evalúa principalmente la función de los testículos y sus valores anormales están relacionados con una baja población de espermatozoides en la muestra de semen (odds ratio=24,03 y p-value<0,001). En un primer momento, se comprobó si el Autoexamen de Semen por sí solo podía predecir la detección de un microbio en la muestra considerando las tres primeras características. Se observó que en el 88,08% de las muestras en las que al menos una de estas tres características fisicoquímicas del Autoexamen de Semen estaba fuera de los valores fisiológicos, se detectó un microorganismo (valor predictivo positivo; abreviado 'PPV'). También se comprobó si la detección de un microorganismo en la muestra podía predecir si al menos una de estas características fisicoquímicas del Autoexamen de Semen se encuentra fuera de los valores fisiológicos.

Se observó que en el 87,66% de las muestras donde se detectó un microorganismo, al menos una de estas características fisicoquímicas del Autoexamen de Semen estaba fuera de los valores fisiológicos (test de sensibilidad).

El Autoexamen de Semen puede predecir con precisión tanto una baja población de espermatozoides (PPV=95,35%) como la presencia de una infección del tracto urogenital (PPV=88,08%), cuando al menos uno de sus cuatro parámetros está fuera los valores fisiológicos. Sin embargo, parece que no puede excluir una condición patológica cuando sus cuatro parámetros están dentro de los valores fisiológicos. Esta observación se debe principalmente a que algunos de los parámetros fisicoquímicos no están incluidos en este autoexamen por la necesidad de equipo de laboratorio.

Una infección del tracto urogenital casi siempre (98,76%) afecta al menos uno de los parámetros seminales del andro-test, que parece estar fuera de los valores fisiológicos. Inversamente, en casi 9 de cada 10 casos (87,68%), si al menos uno de los parámetros seminales está fuera de los valores fisiológicos, se detecta un microorganismo en la muestra de semen en examen.

## **Revisión de los criterios para la valoración de la morfología de los espermatozoides**

En la evaluación de las anomalías morfológicas de los espermatozoides, la mayoría de los laboratorios especializados utilizan criterios estrictos definidos en función de la capacidad de los espermatozoides para atravesar el moco cervical. Si bien este pasaje parece ser un criterio lógico considerando que el análisis de semen es utilizado para describir la capacidad fertilizadora de los espermatozoides, algunos espermatozoides aún pueden ser capaces de fertilizar, a pesar de que existe una infección del tracto urogenital, que a su vez puede amenazar la finalización del embarazo. Obviamente, no nos interesa sólo la capacidad fecundante de los espermatozoides. Estamos interesados en 'llevar un bebé a casa'. Por lo tanto, necesitamos definir nuevos criterios para la evaluación de la morfología de los espermatozoides en función del estado de salud del tracto genital masculino.

Esta es también la oportunidad de enmendar algunos términos utilizados incorrectamente en los criterios anteriores. Por ejemplo, el término "inserción" incorrecta del cuello no es exacto, ya que el cuello no está realmente "insertado" en la cabeza del espermatozoide. Por el contrario, está superado por él. Además, el término 'gotas' citoplasmáticas tampoco es exacto, ya que no describe algo sobre lo que se 'cayó' o de alguna manera se 'agregó' al espermatozoide. Estos hallazgos son en realidad cantidades de citoplasma que no han sido descartadas por el espermatozoide durante su maduración en el epidídimo. Por lo tanto, es obvio que el término más

preciso para estos hallazgos es "residuos citoplasmáticos". Además, dado que la forma de cualquier célula se define a partir de la ultraestructura del citoesqueleto, es racional considerar que las diversas formas de la cabeza de los espermatozoides observadas están relacionadas con esta estructura celular (lea p.31, Voulgaridis et al. ., 2018, <https://doi.org/10.30551/ajs.v1i1.1>).

Además, dado que los espermatozoides completan su maduración en los epidídimos, cualquier factor que afecte la funcionalidad de estos órganos, puede potencialmente afectar y definir la morfología del espermatozoide. Esta hipótesis llevó a investigar si las anomalías morfológicas podrían indicar un mal funcionamiento de los epidídimos. También se pensó en investigar si las anomalías morfológicas no deberían considerarse como una característica permanente de los espermatozoides de una persona. Por el contrario, se observó que algunas anomalías están relacionadas con la presencia de microorganismos específicos y que estas anomalías desaparecen regularmente después del tratamiento de la infección, con excepción de algunos casos donde la cronicidad causó daños irreversibles y permanentes del tracto genital masculino.

El estudio que condujo a la descripción del andro-test investigó la relación entre las diversas anomalías morfológicas de los espermatozoides y la presencia de una infección del tracto urogenital. Se comprobó que efectivamente existe una fuerte relación entre la presencia de un microorganismo y la observación de anomalías morfológicas bien definidas de los espermatozoides. Sorprendentemente, también se comprobó que algunas anomalías son características de la presencia de ciertos microorganismos. También se demostró que esta última observación es un fuerte indicio de la presencia de cierto microorganismo en la muestra de semen. También se describió la sensibilidad y especificidad para cada anomalía morfológica (10). Dado el valor diagnóstico del tipo de anomalías morfológicas, los laboratorios especializados deberán proporcionar una descripción completa de las anomalías morfológicas en el análisis del semen.

La evaluación de las anomalías morfológicas se realiza en frotis secos de semen. Incluso el manual de la OMS se refiere a frotis secos. Es cierto que el estudio que condujo a los criterios de SpermLab se realizó en frotis secos de semen a pesar de que se sostiene que este enfoque es incorrecto. De hecho, por ejemplo, los valores fisiológicos de las dimensiones de un corazón humano se definen en base a las observaciones del corazón de individuos vivos. Las dimensiones del corazón de un cadáver humano difieren significativamente y lo mismo ocurre con las dimensiones de un corazón humano seco. Si bien todos estamos de acuerdo en que sería un error utilizar los valores observados en un corazón humano seco para evaluar la funcionalidad del corazón de un ser humano vivo, en realidad cometemos este error en la evaluación de las anomalías morfológicas del semen humano. Es por ello que los laboratorios especializados en Espermatología deben realizar un estudio multicéntrico para la definición de los valores morfométricos fisiológicos de los espermatozoides humanos mediante la realización de valoraciones morfológicas en espermatozoides frescos (no secos).

## **¿Es realmente indispensable un nuevo análisis de semen?**

El andro-test es un análisis de semen caracterizado por el hecho de que lo que se evalúa es el estado de salud general del tracto urogenital masculino y no solo la capacidad de fertilización del semen. También se caracteriza por un propósito diferente, un objetivo diferente, criterios diferentes y valores fisiológicos diferentes.

Para distinguir el andro-test de otros análisis de semen, se le da un nombre que no nos recuerda a la fertilidad. Su nombre se basa en la palabra griega 'άνδρας' (sp. àndras, ing. man) y describe exactamente lo que hace esta prueba, es decir, el chequeo de un hombre. El término 'andro' ya se usa en la terminología latina como radical o primera síntesis de términos médicos relacionados con el hombre, p. andrógenos, andrología, etc. El nombre andro-test es recordable y comunica inmediatamente de qué se trata, incluso a alguien que no habla griego. Nos recuerda que se trata de un chequeo masculino, mientras que su similitud ortográfica con el conocido Papanicolaou, incita a un test regular al que todo hombre se acostumbrará a hacerse periódicamente. Se espera que esta similitud anime a un hombre a visitar a su urólogo periódicamente de manera similar a lo que ya se le ha enseñado a hacer a una mujer.

Ya se ha comprobado que al menos los laboratorios no especializados no siguen las recomendaciones de la OMS para el análisis de semen. Para garantizar que la prueba andro se ejecutará e implementará correctamente, esta prueba ya ha sido patentada y solo se puede realizar bajo certificación, acreditación y licencia. Se pretende una red de asociaciones nacionales

de Espermatología para auditar el cumplimiento de las directrices de buenas prácticas de los laboratorios especializados en Espermatología.

### **Hacer que los hombres se preocupen por su salud**

La valoración de las características fisicoquímicas del semen nos aporta información sobre la función de las glándulas del aparato genital masculino, principalmente de la próstata y de los túbulos seminíferos, ya que estos dos son los primeros afectados cada vez que se produce una infección del aparato genital. Algunas de las características fisicoquímicas del semen pueden ser evaluadas por el propio individuo. De hecho, un volumen de semen de tres días menor que el volumen de una avellana o mayor que el volumen de una cereza es una fuerte evidencia de infección que cualquier hombre podría evaluar fácilmente en casa observando la eyaculación en el condón o incluso más confiablemente con un tapón de orina y una jeringa de 5 ml. Sin embargo, un volumen fisiológico no excluye una infección. Otros parámetros, como el pH o la morfología, pueden ser los únicos que se vean afectados, sin embargo, solo un biólogo experto podría evaluarlos, mientras que también se necesita equipo de laboratorio especializado.

Las irregularidades en el ciclo menstrual notifican a una mujer sobre un mal funcionamiento de sus ovarios. Sin embargo, los hombres apenas pueden percibir los signos que pueden indicar un mal funcionamiento de los testículos. Además, a diferencia de las mujeres, los hombres rara vez perciben los síntomas de una infección de su tracto urogenital. Como resultado, un hombre no busca asesoramiento a un urólogo. Sin embargo, aunque a cada mujer se le ha enseñado a visitar regularmente a su ginecólogo desde la adolescencia, nunca se ha aconsejado a los hombres jóvenes que visiten a un urólogo de manera preventiva, a pesar de la alta prevalencia de ITU en hombres jóvenes. Por ello, es su ginecólogo el que se ocupa de la astenozoospermia de su pareja, que casi siempre se salva aplicando una técnica de reproducción asistida (ART.). La baja motilidad puede indicar una infección, lo que podría influir negativamente en el resultado de la fertilización in vitro y comprometer la salud de su próstata, cualquiera que sea el resultado de la A.R.T. Por lo tanto, es obligatorio tratar previamente su tracto urogenital y luego consultar para una técnica de reproducción asistida, si aún es necesario.

Aunque las infecciones urogenitales suelen presentarse con síntomas en mujeres, las de Ureaplasmas, Mycoplasmas o Chlamydia suelen ser asintomáticas en ambos sexos. Además, estas infecciones son las más prevalentes y pueden amenazar seriamente la reproducción provocando, entre otras, salpingitis, aborto espontáneo, infecciones del sistema nervioso central del lactante y epididimitis. Estas infecciones difícilmente se detectan a menos que se realicen costosas pruebas de diagnóstico. Por lo tanto, incluso cuando la detección falla, el tratamiento de ambos miembros de la pareja debe considerarse ante la presencia de evidencia (11, 12, 13). El andro-test nos proporciona una fuerte evidencia de tal infección, haciendo de esta prueba una herramienta valiosa que podría guiar el diagnóstico incluso indirectamente en las parejas femeninas. Por lo tanto, se espera que el andro-test mejore la calidad de vida tanto en hombres como en mujeres. En consecuencia, se sugiere razonablemente que es la prueba más adecuada en un concepto de chequeo preventivo periódico de la salud de un hombre.

Dado que un hombre rara vez percibe los síntomas de una infección de su tracto urogenital, deberá realizarse un androtest periódicamente y al menos cada vez que su pareja presente síntomas de una ITU. Además, un hombre podría sospechar directamente una infección de su tracto urogenital simplemente evaluando por sí mismo algunas de las características fisicoquímicas de su semen. Para ello se ha definido el autoexamen de semen. Este autoexamen consiste en tres sencillos pasos que todo hombre puede seguir fácilmente, como se muestra en el siguiente cuadro:

### **Autoexamen de semen**

**Paso uno.** Evaluar el volumen de semen: un volumen de semen de tres días más pequeño que el de una avellana o más grande que el de una cereza es una fuerte evidencia de infección que cualquier hombre podría evaluar fácilmente en casa observando la eyaculación en el condón o incluso de forma más fiable con un tapón para orina y una jeringa de 5 ml.

**Paso dos.** Evaluar el color y la consistencia del semen: el líquido no debe ser transparente, rojo o marrón y no debe contener geles que se disuelvan más tarde de 30 minutos desde la eyaculación.

**Paso tres.** Evaluar la viscosidad del semen: el líquido no debe ser acuoso.

*Advertencia. Las declaraciones anteriores consisten solo en indicaciones que inducirán a un hombre a visitar a un urólogo. La ausencia de estas indicaciones no excluye una condición patológica. Otros parámetros, como el pH o la morfología, pueden ser los únicos afectados, sin embargo, solo un biólogo experto puede evaluarlos, siendo necesario un equipo de laboratorio especializado. Por lo tanto, se recomienda el andro-test periódico.*

Es obligatorio que cada sistema nacional de salud sensibilice a los hombres sobre un chequeo preventivo periódico de su tracto urogenital. Inspirar, crear y potenciar el vínculo entre el hombre y su urólogo. De manera similar al autoexamen de mamas, a cada hombre se le puede enseñar a palpar sus testículos y evaluar las características de su semen. Deberá visitar a su urólogo de forma preventiva y hacerse un andro-test periódicamente.

La conocida prueba de Papanicolaou puede detectar una neoplasia o inflamación solo en la zona del cuello uterino, mientras que no nos proporciona ningún indicio del patógeno involucrado. El resultado negativo de un examen microbiológico consecuente en orina, secreciones vaginales o frotis cervical no puede excluir la presencia de infección.

La medición de los niveles de PSA (antígeno prostático específico) en sangre se implementa en la evaluación de la glándula prostática. Aunque la prueba de PSA ha sido aprobada para la detección anual de cáncer de próstata en hombres mayores de 50 años, no es específica para el cáncer de próstata. Sus niveles pueden estar elevados en una hiperplasia prostática benigna, mientras que, en una prostatitis, que a menudo ocurre en hombres más jóvenes, sus niveles pueden ser más altos de lo normal o incluso notablemente bajos, pero no se han determinado los límites inferiores para el PSA. Sin embargo, debido a la falta de especificidad y la asociación de la prueba de PSA con el diagnóstico de cáncer, podría no ser el candidato ideal para la detección de prostatitis en hombres de todas las edades. Recientemente, investigadores australianos se centraron en la detección de biomarcadores específicos para el cáncer de próstata en el líquido seminal (14). Esto convierte al semen en un material biológico ideal para el chequeo masculino.

Además, el análisis del semen según los criterios de SPERMLAB (andro-test) nos aporta mucha más información que la del estado de la próstata. No solo valora el estado de todo el aparato genital, sino que también nos proporciona las indicaciones del patógeno implicado, hecho que contribuye esencialmente en la detección del patógeno mediante un examen microbiológico exhaustivo o incluso su repetición cuando el clínico lo considere oportuno. La detección del patógeno en un hombre consiste en una fuerte evidencia de que este patógeno también está presente en su pareja, independientemente del uso de condón, ya que en general no se usa correctamente y ya que el contacto directo de los genitales no es necesario para estar infectado. Por ejemplo, es muy común tocar los genitales con la misma mano que se quitó el condón hace un momento. Sin embargo, el examen microbiológico puede simplemente no detectar el patógeno, a pesar de que puede estar presente.

En consecuencia, el andro-test es la prueba más adecuada para la evaluación de la salud del tracto genital de un hombre, mientras que su implementación periódica en el concepto de un chequeo preventivo periódico de un hombre puede contribuir esencialmente en el diagnóstico y prevención de condiciones patológicas graves en hombres, mujeres y niños.

### **Un análisis de semen para la concienciación de los hombres sobre la importancia del chequeo andrológico preventivo**

El andro-test condujo al desarrollo del Autoexamen del Semen, un método que permite a cada hombre, sin necesidad de capacitación especial, equipo de laboratorio o cualquier costo, verificar la salud de su tracto genital, regularmente, con comodidad y discreción de su espacio personal. Este autoexamen pretende sensibilizar a los hombres de todo el mundo sobre la importancia del chequeo andrológico preventivo. Con el fin de garantizar que este chequeo preventivo se realizará de forma estandarizada, se le da el nombre de Chequeo Andrológico Anual. En cuanto a la mejora de los servicios para promover la salud global, se denota la importancia del andro-test en la práctica clínica y la prevención de cuadros patológicos graves en hombres, mujeres y niños.

Los laboratorios especializados en Espermatología deberán abandonar la investigación de estandarizar los procedimientos de evaluación de la capacidad fecundante del semen humano y considerar seriamente investigar la importancia de evaluar los parámetros seminales bajo el

prisma de la salud integral del aparato genital masculino. Los Criterios de SpermLab y la nueva clasificación de anomalías morfológicas descritas en el estudio de andro-test deben convertirse en una guía fundamental para futuros estudios.

### **El andro-test es realizado únicamente por laboratorios especializados en Espermatología**

La principal causa de la falta de cumplimiento de las recomendaciones de la OMS para la evaluación de la capacidad de fertilización del semen es la falta de equipo adecuado y capacitación de los laboratorios no especializados y la falta de interés de las clínicas de FIV. Irónicamente, siempre que el análisis de semen se considere una prueba de fertilidad, las clínicas de FIV se consideran justificadamente como si fueran los expertos. El diagnóstico y tratamiento correctos dependen de tres condiciones esenciales: a) la correcta instalación del laboratorio, b) la correcta evaluación de la muestra y c) la competencia del médico. Por lo tanto, para garantizar la correcta implementación e interpretación de andro-test, esta prueba es realizada únicamente por técnicos acreditados en laboratorios certificados bajo la condición de que sigan los Criterios de SpermLab.

Ya hay miles de biólogos con formación especial en la evaluación del semen humano en todo el mundo. Estos técnicos pueden gestionar ellos mismos un laboratorio especializado en Espermatología o ser empleados en un laboratorio debidamente equipado. El técnico acreditado solo tiene que iniciar sesión en una plataforma basada en la nube apropiadamente diseñada, insertar los resultados del análisis e imprimir el formulario de andro-test en cuya parte inferior se recomienda al examinado consultar a un urólogo-andrólogo para la interpretación de los resultados. La plataforma contiene pautas para el andro-test. Los datos de identificación del examinado no se transmiten a la base de datos. Este proceso permite el Control de Calidad Externo de cada técnico (y laboratorio) que realiza el andro-test y garantiza que el examinado sea aconsejado para consultar a un urólogo-andrólogo.

La acreditación de los técnicos y la certificación del laboratorio es competencia de la Asociación Nacional de Espermatología como miembro de la Asociación Internacional de Espermatología. El técnico deberá ser graduado en Ciencias Biológicas y capacitado en el análisis de semen humano para ser miembro de la Asociación Nacional de Espermatología. La pertenencia a la Asociación nacional garantiza que el técnico respetará y seguirá las directrices de buenas prácticas y las decisiones de la Asociación Nacional/Internacional de Espermatología.

### **Una red de Asociaciones nacionales de Espermatología**

Como ya se demostró, la implementación correcta de una prueba es fundamental. Ya existe suficiente experiencia del mal uso de las recomendaciones de la OMS en la realización de un análisis de semen para la evaluación de la capacidad fecundante y la interpretación errónea de los resultados. Para evitar confusiones con el análisis de semen para la evaluación de la fertilidad, la nueva prueba tuvo que recibir un nombre diferente. Para evitar cualquier falta de conformidad ya observada en todo el mundo para la prueba de fertilidad, este nombre tenía que estar protegido por derechos de autor y alguien tenía que auditar la correcta aplicación de la prueba. Por lo tanto, la nueva prueba fue patentada y se le asignó el nombre de andro-test en 2015. Además, esta prueba se realizará en todo el mundo y la mejor manera de garantizar el correcto desempeño de esta prueba es crear una red de Asociaciones locales de Espermatología que auditen la conformidad de los laboratorios y de los técnicos con las normas de buenas prácticas en Espermatología acordadas internacionalmente. En Grecia, ya hemos constituido la organización no gubernamental sin ánimo de lucro Hellenic Association of Spermatology (HAS), en 2017, con el propósito de promover el conocimiento, el control de calidad y las buenas prácticas en el campo de la Espermatología humana para proteger la salud humana. Los biólogos interesados en el estudio del semen humano de todo el mundo están invitados a reunirse en Asociaciones nacionales no gubernamentales de Espermatología sin fines de lucro bajo la coordinación de la Asociación Internacional de Espermatología. Se espera que el trabajo en red resalte el papel del biólogo-espermatólogo, fortalezca el reconocimiento de su competencia y cree un nuevo mercado de laboratorios especializados en Espermatología (dirigidos por biólogos). Considerando la situación actual descrita en los párrafos anteriores con respecto a la Salud Masculina, se hace evidente que la necesidad mundial de laboratorios especializados en Salud Masculina es notable.

### **Referencias**

1. Voulgaridis, G.Z. andro-test: the semen analysis for men's health checkup following the SpermLab's Criteria. *International Journal of Spermatology*. 2018, Vol. 1, 1, pp. 1-63.
2. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed. Cambridge : Cambridge University Press, 1999.
3. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th. Geneva : WHO Press, 2010.
4. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6th edition. Geneva : WHO Press, 2021.
5. Rothmann, S. A. and Reese, A. A. Semen analysis: the test techs love to hate. *Med Lab Obs*. 2007.
6. Walczak-Jedrzejowska, R., et al. Semen analysis standardization: is there any problem in Polish laboratories? . *Asian J Androl*. 2013.
7. Riddell, D., Pacey, A. and Whittington, K. Lack of compliance by UK andrology laboratories with World Health Organization recommendations for sperm morphology assessment. *Human Reproduction*. 2005.
8. Cooper, T.G., Hellenkemper, B. and Nieschlag, E. External Quality Control for Semen Analysis in Germany. *J Reproduktionsmed Endokrinol*. 2007.
9. Keel, B.A., et al. Lack of standardization in performance of the semen analysis among laboratories in the United States. *Fertil Steril*. 2002.
10. Voulgaridis, G.Z. Andro-test & Semen Self-Exam: their importance in prevention and in the diagnostic process. *International Journal of Spermatology*. 2020, Vol. 2, 1, pp. 1-19.
11. Kasper, Dennis L., et al. *Harrison's principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York : McGraw-Hill Companies, 2005.
12. Lerner, K. L. and Lerner, B. W. *World of Microbiology and Immunology*. s.l. : The Gale Group, Inc., 2003.
13. Talaro, Kathleen Park and Talaro, Arthur. *Foundations in Microbiology*. 4th ed. s.l. : McGraw-Hill Companies, 2002.
14. Selth, L.A., et al. Human seminal fluid as a source of prostate cancer specific microRNA biomarkers. *Endocr Relat Cancer*. Aug 2014, Vol. 21, 4, pp. L17-21.

Las opiniones expresadas en este documento son de exclusiva responsabilidad del autor y no necesariamente representan la opinión de los editores.

*Traducido, revisado y editado por la Dra. Rocío Núñez Calonge.*



# EL ANÁLISIS BÁSICO DEL SEMEN

Gerardo Cerezo Parra<sup>1</sup>

Luna María López Pérez<sup>1,2</sup>

Sergio Arturo González Ortiz<sup>3</sup>

Luis Sarabia Villar<sup>4</sup>

Hugo Manuel Rodríguez Hernández<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Espermatozoides LÁFER y FERTIMÉXICO, Ciudad de México, México y Guadalajara, Jalisco, México. <sup>1,2</sup>Universidad Veracruzana, Campus Veracruz, Veracruz. México. <sup>3</sup>Facultad de Bioanálisis y Enfermería. Universidad Veracruzana, Campus Xalapa, Veracruz. México. <sup>4</sup>Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. <sup>5</sup>Centro de Ginecología, Genética y Reproducción Asistida "CGYRA", Hospital del Pacífico, Acapulco, Guerrero, México.

Autor correspondiente: Biol. Gerardo Cerezo Parra. Tuxpan 10 Int. 606, Col. Roma Sur, C.P. 06760, Alcaldía Cuauhtémoc, Ciudad de México, México. Teléfono +52 55 5264 0563. Correo electrónico: [gcerezop@gmail.com](mailto:gcerezop@gmail.com)

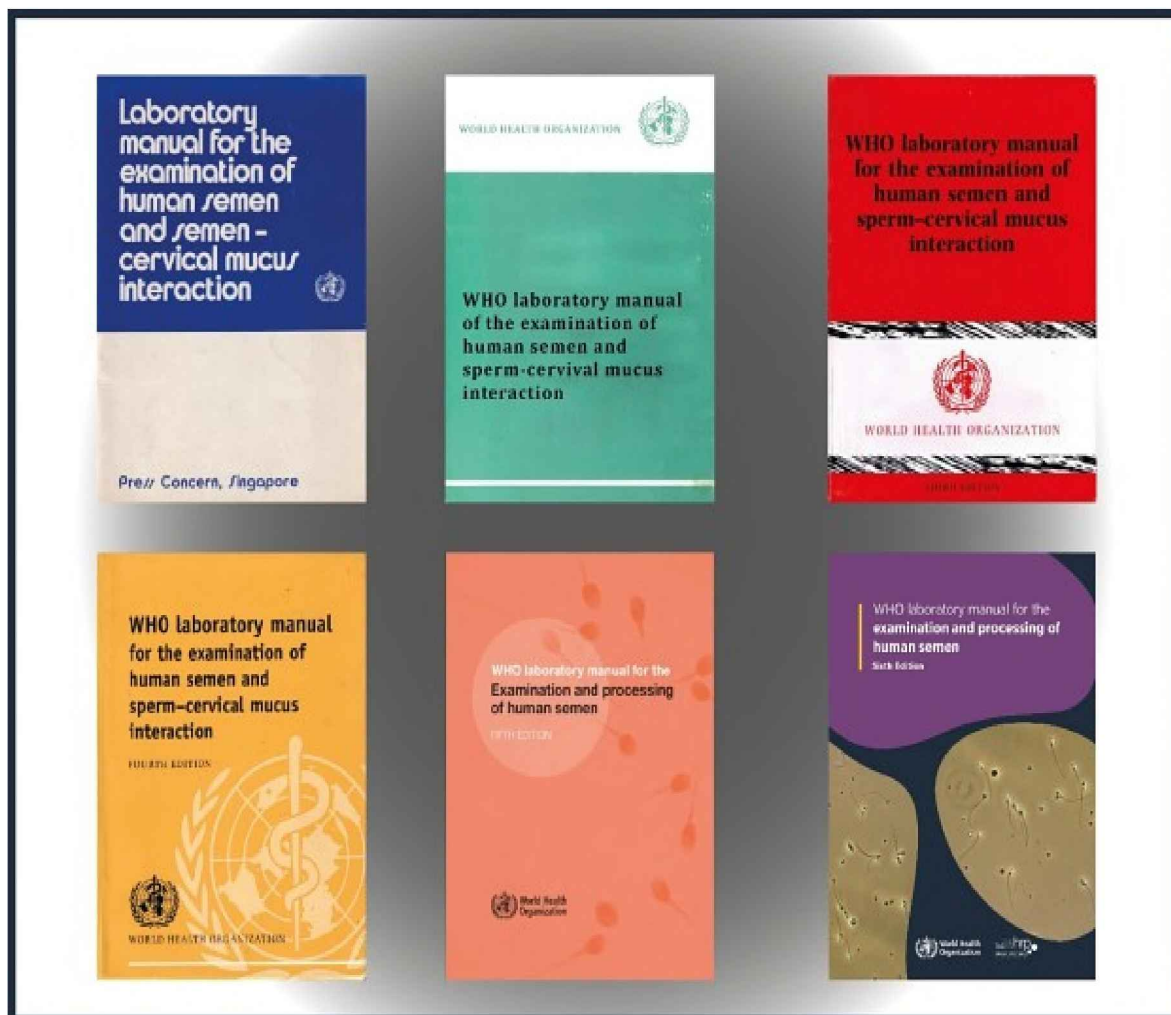
## Introducción

El análisis básico del semen (ABS) es un estudio sistemático de los diferentes componentes que forman el eyaculado; es la prueba de laboratorio más útil que nos permite conocer la fisiología reproductiva masculina. Uno de los principales objetivos para realizar este estudio, es evaluar la fertilidad del hombre.

El ABS es subjetivo por naturaleza y está sujeto a errores propios de su análisis; de ahí que lograr una estandarización de este estudio constituye un gran reto, ya que existe variabilidad en los parámetros del ABS entre diferentes laboratorios. Desde estudios hechos hace más de 75 años hasta los años recientes, se han venido mostrando diferencias en los métodos de evaluación para delimitar los valores de hombres fértiles e infértiles, manifestando, incluso hasta la fecha, problemas de variabilidad entre analistas de diferentes laboratorios (1,2).

Es importante la estandarización del ABS ya que nos permite comparar los resultados de los diversos laboratorios en diferentes tiempos y para esto es necesario que los métodos sean robustos y estandarizados. Los resultados obtenidos que utilizan métodos diferentes no pueden ser comparados (1).

En 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó el primer manual para el análisis del semen humano, y posteriormente se han publicado diferentes ediciones en los años, 1987, 1992, 1999, 2010 y 2021. (**Figura 1**) Estas publicaciones contienen recomendaciones con el objetivo de lograr una estandarización en el ABS a nivel mundial.



**Figura 1.** Publicaciones del manual para el análisis del semen humano de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

### **Nuevos criterios del manual de la OMS**

En el año 2021 y después de 11 años desde su última edición, la OMS publicó la 6ª edición de su manual para el análisis y procesamiento del semen humano. En este capítulo comentaremos las actualizaciones del análisis básico del semen de esta última edición. Como todos los estudios del laboratorio clínico, el ABS debe contar con la fase preexamen, fase examen y fase post examen para lograr un estudio que garantice la calidad de su análisis.

### **Colección e instrucciones a los pacientes para la muestra seminal**

Es muy importante que los pacientes entiendan las instrucciones, para obtener una muestra seminal ideal para un ABS confiable. A continuación, se puntualizan estas instrucciones:

- a) El paciente debe acudir al laboratorio con las manos y el pene aseados,
- b) Tener de 2 a 7 días de abstinencia sexual o eyaculación,
- c) La colección de la muestra seminal debe ser de preferencia por masturbación,
- d) Utilizar un recipiente de plástico de boca ancha y tapa hermética, de preferencia estéril,
- e) Recolectar la muestra de semen en una habitación privada cercana al laboratorio,
- f) La muestra seminal se debe coleccionar completamente dentro del recipiente y no se debe perder ninguna fracción del eyaculado,
- g) Si el paciente no puede coleccionar la muestra en una habitación privada, puede coleccionar la muestra en un lugar cercano al laboratorio, ya sea en su casa o en una habitación de un hotel,
- h) Si el paciente no puede coleccionar la muestra por masturbación, puede coleccionar el semen mediante una relación sexual, siempre y cuando utilice condones especiales,

i) Informar al paciente que el *coitus interruptus* no es una medida aceptable de colección de la muestra de semen, ya que puede perderse la primera fracción del eyaculado y porque las secreciones vaginales pueden contaminar el semen (3).

### Colección de las muestras seminales

Los recipientes más utilizados son los vasos recolectores de muestras de orina/heces y los condones especiales (**Figura 2**); éstos siempre deben ser estériles, no tóxicos y estar a temperatura ambiente, entre 20-37°C, para evitar el choque térmico de los espermatozoides (4, 5). Se debe etiquetar con el nombre del paciente, nombre de la esposa (para la muestra homologa), fecha y hora de recolección, muestra completa o incompleta, días de abstinencia sexual, nombre del médico y procedimiento a seguir (3).



**Figura 2.** Recipientes utilizados para la colección del semen a) Recipiente de plástico estéril de 120 ml. de boca ancha. b) Condón especial *Male-FactorPak* de polipropileno, no tóxico para los espermatozoides.

### Análisis macroscópico del semen

El semen humano es una mezcla de componentes producidos por las glándulas accesorias del tracto reproductivo y los espermatozoides (6).

#### Coágulo

El componente responsable de la formación espontánea del coágulo seminal que se forma inmediatamente después de la eyaculación (**Figura 3**), es un complejo de proteínas llamadas semenogelina I (Sg I) y semenogelina II (Sg II), dichos elementos son producidos en la vesícula seminal y liberados en la última porción del eyaculado para formar parte del plasma seminal total, constituyendo del 20% al 40% de las proteínas presentes en el plasma (7).



**Figura 3.** Coágulo presente en el semen, previo al proceso de licuefacción.

### Licuefacción

Es un proceso de proteólisis catalizado por enzimas hidrolíticas secretadas por la próstata, epidídimo y el espermatozoide; estas enzimas incluyen al activador de plasminógeno, el antígeno específico prostático (PSA) así como algunas proteasas, peptidasas y  $\alpha$ -amilasas (8).

El tiempo de licuefacción es definido como el tiempo que transcurre en el paso del gel del eyaculado (masa semisólida o coágulo) hasta volverse un líquido homogéneo (9). La licuefacción del semen a temperatura ambiente normalmente ocurre entre los 15 y 60 minutos post-eyaculación; cuando se ha completado este proceso se genera un líquido con textura homogénea, sin embargo, algunas muestras seminales pueden presentar algunos gránulos gelatinosos que no parecen tener ningún significado clínico (3).

Es recomendable seguir las siguientes indicaciones:

- a) Una vez colectada la muestra de semen, se debe colocar en una incubadora a 37°C.
- b) La muestra de semen debe observarse cada 10 minutos para saber si se licuó completamente. La mayoría de los eyaculados se licuan dentro de los primeros 30 minutos.
- c) Revisar bien si la muestra contiene coágulos o filamentos.
- d) Cuando la muestra esté completamente licuada se debe anotar el tiempo que tardó en hacerlo (tiempo de licuefacción).

Para ayudar a que el semen se licúe correctamente se puede utilizar un mezclador orbital durante los primeros 15 minutos (3). En algunas muestras no sucede la licuefacción completamente dificultando la evaluación del semen, en estos casos, es necesario utilizar tratamientos para romper la hiperviscosidad del semen. La OMS recomienda el uso de jeringas, medio fisiológico o bromelina que es una enzima proteolítica.

### Viscosidad

La evaluación de la viscosidad (**Figura 4**) se realiza de la siguiente manera:

- a) Primeramente, homogenizar la muestra de semen y aspirarla con una pipeta Pasteur o de plástico, se deja caer y se observa la longitud del filamento.
- b) Se considera viscosidad normal, sí la muestra de semen presenta gotas pequeñas bien definidas, cayendo libremente con cierta consistencia, ó forma un filamento menor a 2 cm.
- c) Se considera viscosidad anormal, sí la muestra de semen forma un filamento mayor a 2 cm. de longitud.



**Figura 4.** Viscosidad del semen, a) Normal, b) Anormal.

### Apariencia

El color o apariencia normal del semen es gris opalescente homogéneo (Figura 5). Cuando la concentración de espermatozoides es muy baja, el semen es traslucido, o puede tomar coloraciones rojas cuando hay presencia de células sanguíneas en el eyaculado (hemospermia). En algunos casos el semen es de color amarillo, cuando el paciente está tomando vitaminas o drogas, también puede ser por periodos largos de abstinencia sexual. También el semen puede tener un color verde claro por procesos infecciosos debido a la presencia de exudados (3).



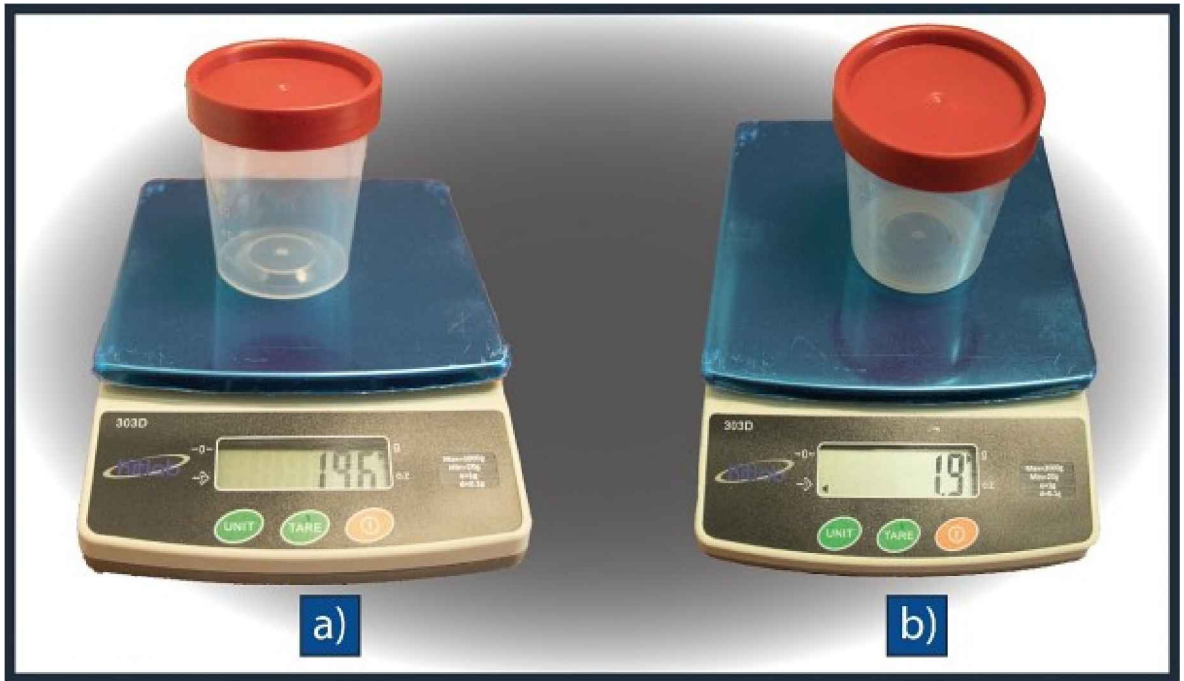
**Figura 5.** Semen con apariencia gris opalescente.

### Volumen

Desde la edición pasada del manual de la OMS, para la evaluación del volumen del eyaculado se utiliza una balanza digital (**Figura 6**) y se realiza de la siguiente manera:

- a) Pesar el recipiente con su etiqueta previamente a la obtención de la muestra de semen.
- b) Pesar nuevamente el recipiente, una vez que el paciente haya depositado el semen en el recipiente.

- c) Se resta el valor del peso del recipiente vacío, al peso del recipiente con la muestra de semen.
- d) Se obtiene la diferencia de peso en gramos (la densidad del semen está entre 1.03 y 1.04 gramos, se asumen que 1 gramo es igual a 1 mililitro) y el volumen se reporta en mililitros (3).



**Figura 6.** Evaluación del volumen utilizando una balanza digital, a) Previo a la colección del semen, b) Posterior a la colección del semen.

## pH

El pH se debe medir inmediatamente después de la licuefacción de la siguiente manera:

- a) Homogeneizar la muestra de semen.
- b) Colocar una gota de semen en una tira reactiva para pH.
- c) Comparar el color de la tira, con el control.

Es importante comentar que, en la última edición del manual de la OMS, no es obligatorio evaluar el pH del semen.

## Motilidad

### Homogenización de la muestra

Con una pipeta de plástico, mezclar la muestra de semen muy suavemente, evitando hacer burbujas.

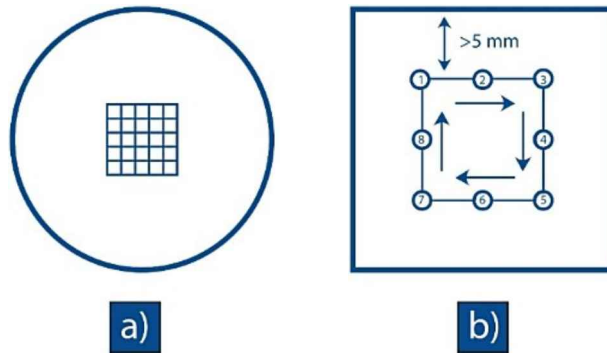
### Preparación de la alícuota

Una vez que se haya homogeneizado la muestra de semen, tomar 2 alícuotas de 10  $\mu$ l cada una y cubrir con cubreobjetos de 22 X 22 mm. Realizar 2 evaluaciones a una temperatura de 20 a 37°C.

### Elección de los campos microscópicos

Evaluar la motilidad espermática con el objetivo de 40X, también se puede utilizar un ocular reticulado o elegir los campos a partir de 5 mm del borde del cubreobjetos hacia el interior. Se

deben elegir los campos microscópicos como se muestra en la **Figura 7**.



**Figura 7.** a) Selección sistemática de los campos dentro de la cuadrícula para el conteo de la motilidad. b) Límites de 5 mm dentro de la alícuota que no se debe utilizar para contar y campos seleccionados para el conteo.

La motilidad espermática se clasifica de acuerdo con las siguientes categorías:

**-Motilidad Progresiva rápida (Espermatozoides con velocidades  $\geq 25 \mu\text{m/s}$ ):** Espermatozoides con movimiento activo; lineal o en círculos grandes, cubriendo una distancia desde el punto de inicio hasta el punto final, de la mitad de la longitud de su cola, en un segundo.

**-Motilidad Progresiva lenta (Espermatozoides con velocidades de 5 a  $< 25 \mu\text{m/s}$ ):** Espermatozoides con movimiento activo, lineal o en círculos grandes, cubriendo una distancia desde el punto de inicio hasta el punto final, de la longitud de su cabeza o menos de la mitad de la longitud de su cola, en un segundo.

**-Motilidad No Progresiva (Espermatozoides con velocidades  $< 5 \mu\text{m/s}$ ):** Todos los patrones de movilidad con ausencia de progresión, por ejemplo: nado en círculos pequeños, la fuerza del flagelo difícilmente desplaza a la cabeza del espermatozoide o cuando únicamente se observa el batimiento del flagelo.

**-Inmóviles:** Espermatozoides sin movimientos progresivos o no progresivos.

#### Conteo de la motilidad

a) Evaluar diferentes campos (mínimo 5) y contar mínimo 200 espermatozoides por todas las categorías.

b) Contar primero, en cada campo y en forma simultánea, la categoría de los espermatozoides con motilidad progresiva rápida (**PR**) y los de motilidad progresiva lenta (**PL**), posteriormente, en el mismo campo donde se contaron las categorías anteriores y en forma simultánea, contar los espermatozoides no progresivos (**NP**) y los Inmóviles (**IM**).

Realizar 2 conteos en 2 alícuotas diferentes. Primero se pone la primera alícuota y se realiza el conteo, al terminar, se pone la segunda alícuota y se realiza el segundo conteo.

c) Calcular el promedio de los porcentajes y las diferencias de los dos conteos de los grados de movilidad (PR, PL, NP e IM).

d) Determinar si es aceptable las diferencias de acuerdo con la tabla 1, la cual señala cual es la diferencia máxima aceptada que ocurre entre los conteos de una muestra dada en el 95% de los casos.

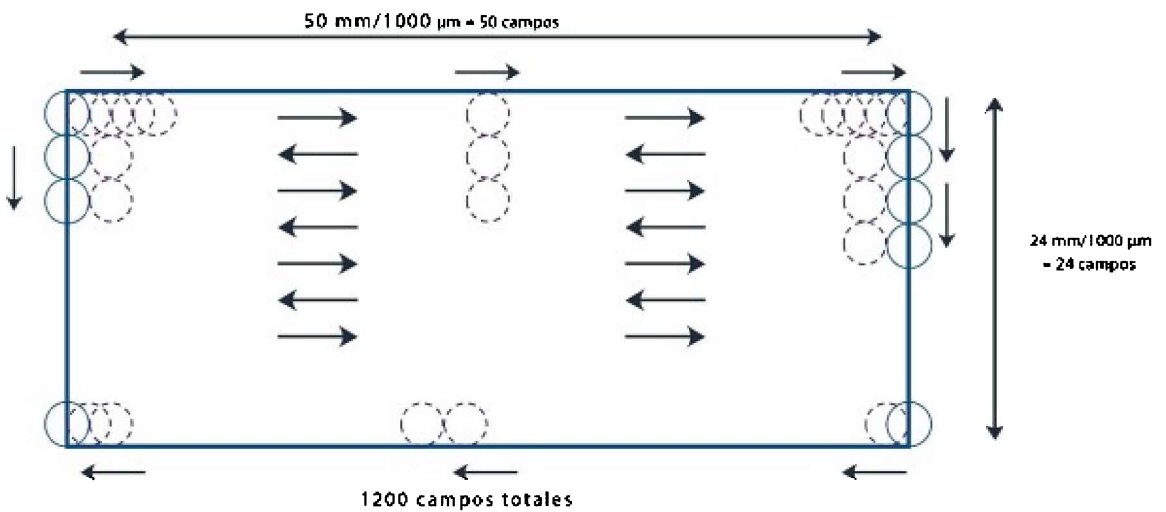
e) Si la diferencia entre los dos porcentajes es aceptable, reportar el promedio del porcentaje del grado de motilidad (PR, PL, NP e IM). Si la diferencia es muy alta, repetir nuevas preparaciones de alícuotas y conteos.

**Tabla 1.** Diferencia máxima aceptada entre dos porcentajes determinados de conteos por duplicado de 200 o 400 espermatozoides. Basado en el intervalo de confianza del 95% aproximadamente. Aplicable para motilidad.

DIFERENCIA MÁXIMA ACEPTABLE	RANGO (%)
2	1
3	2-3
4	4-6
5	7-9
6	10-13
7	14-19
8	20-27
9	28-44
10	45-55
9	56-72
8	73-80
7	81-86
6	87-90
5	91-93
4	94-96
3	97-98
2	99

Muestras con bajo número de espermatozoides

En los casos donde el número de espermatozoides por campo es muy bajo (<4 espermatozoides en objetivo 40X), se debe realizar un escaneo de toda la placa para detectar el mayor número de espermatozoides móviles (**Figura 8**).





**Figura 8.** Escaneo de toda la placa (aproximadamente 1200 campos, magnificación de 200X).

### Aglutinación Espermática

Cuando se evalúa la motilidad de los espermatozoides (en un objetivo de 40X), también se debe evaluar la aglutinación y agregación espermática.

La aglutinación espermática es la unión de cabeza-cabeza, cola-cola, pieza intermedia-cola de 2 o más espermatozoides móviles (3; **Figura 9**).

La aglutinación se clasifica de la siguiente manera:

- Grado 1 (Aislado): <10 espermatozoides por aglutinación, muchos espermatozoides libres
- Grado 2 (Moderado): 10-50 espermatozoides por aglutinación, espermatozoides libres.
- Grado 3 (Grande): aglutinaciones de > 50 espermatozoides, algunos espermatozoides libres.
- Grado 4 (Gruoso): todos los espermatozoides aglutinados y aglutinaciones interconectadas.

El tipo de unión de los espermatozoides se clasifica de la siguiente manera:

- a) Tipo "A": cabeza-cabeza.
- b) Tipo "B": cola-cola (cabezas son vistas libres y moviendo la aglutinación libremente).
- c) Tipo "C": cola con punta de las colas.
- d) Tipo "D": compuesta (cabeza-cabeza y colas-colas).
- e) Tipo "E": Segmentada (cabezas y colas enredadas).


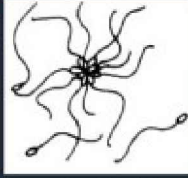
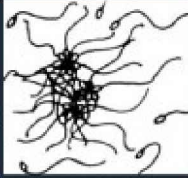
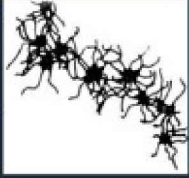
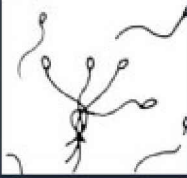
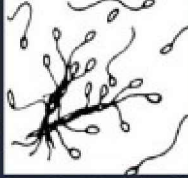
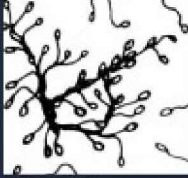


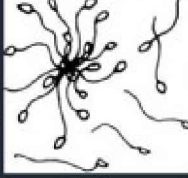
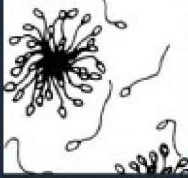

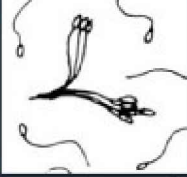


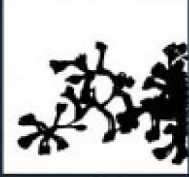


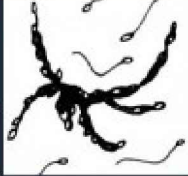

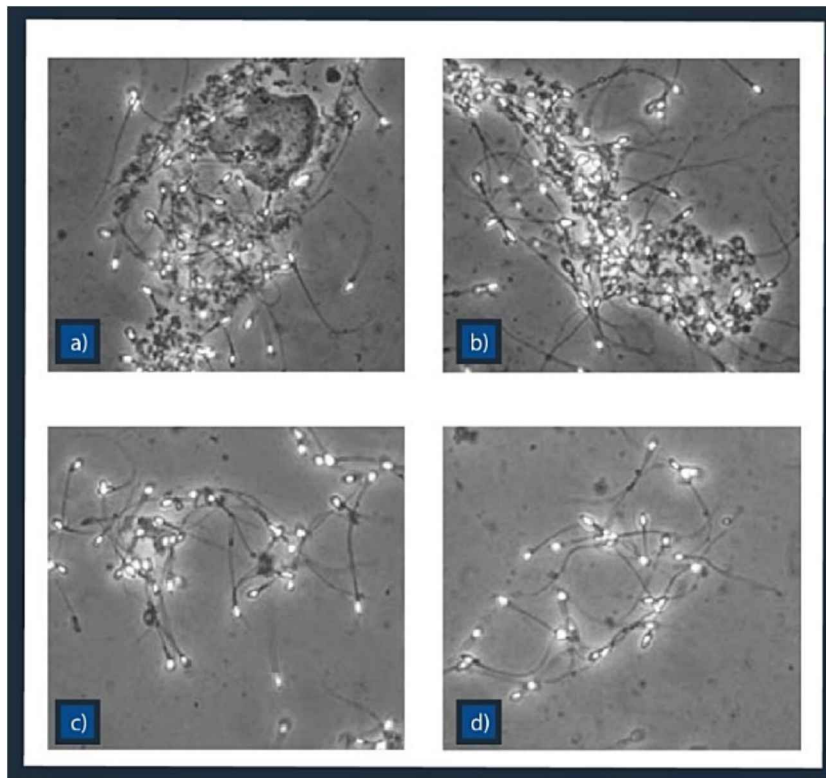
PARTES DE UNIÓN	GRADOS DE AGLUTINACIÓN			
	1. Aislada (< 10 spz aglutinados)	2. Moderada ( 10-50 spz aglutinados)	3. Larga (>50 spz aglutinados)	4. Gruesa ( Todos los spz aglutinados)
A. Cabeza con cabeza				
B. Cola cola, las cabezas son libres y se mueven libres de la aglutinación				
C. Punta de flagelo con punta de flagelo				
D. Mezclado (Aglutinación de cabeza con cabeza y flagelo con flagelo)				
E. Enredado (Cabezas y flagelos enredados. Las cabezas no están libres de la aglutinación )				

Figura 9. Diferentes grados de la aglutinación espermática.

### Agregación Espermática

La agregación es la adherencia de un grupo de espermatozoides móviles a otro grupo de espermatozoides inmóviles, pero también es la adherencia de los espermatozoides móviles a los filamentos de moco presentes en el semen, así como a otro tipo de células o detritus (3,10; **Figura 10**).



**Figura 10.** Espermatozoides agregados y aglutinados: a) agregación a célula epitelial, b) agregación a residuo o detritus, c) y d) aglutinaciones.

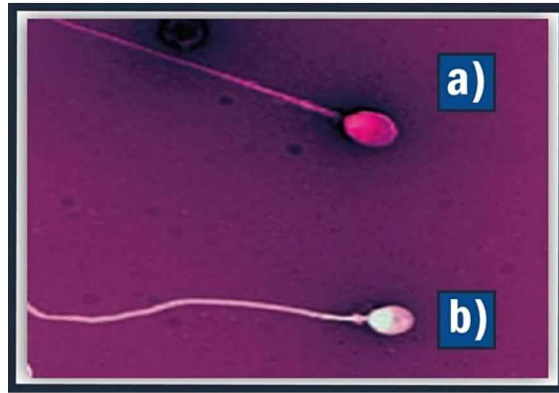
### Vitalidad

La vitalidad espermática es la cantidad de espermatozoides vivos en la muestra seminal, la cual es determinada por la evaluación de la integridad de la membrana y núcleo celular (11).

No se considera necesario evaluar la vitalidad cuando al menos el 40% de los espermatozoides tienen una motilidad progresiva y no progresiva. Sin embargo, en muestras con poca motilidad, la técnica de vitalidad es importante para discriminar entre espermatozoides inmóviles muertos o inmóviles vivos (3).

La técnica más recomendada por el manual de la OMS es la tinción con eosina-nigrosina y a continuación se describe:

1. Homogeneizar la muestra de semen.
  2. Colocar 50  $\mu$ l de semen y 50  $\mu$ l de la solución de eosina-nigrosina e incubar por 30 segundos en un tubo cónico pequeño.
  3. Tomar de 12 a 15  $\mu$ l de la mezcla y hacer un frotis uniforme sobre el área completa del portaobjetos (excepto en el área de la etiqueta).
  4. Evaluar mínimo 200 espermatozoides con el objetivo de 100x.
5. La vitalidad es expresada como el porcentaje de espermatozoides vivos.



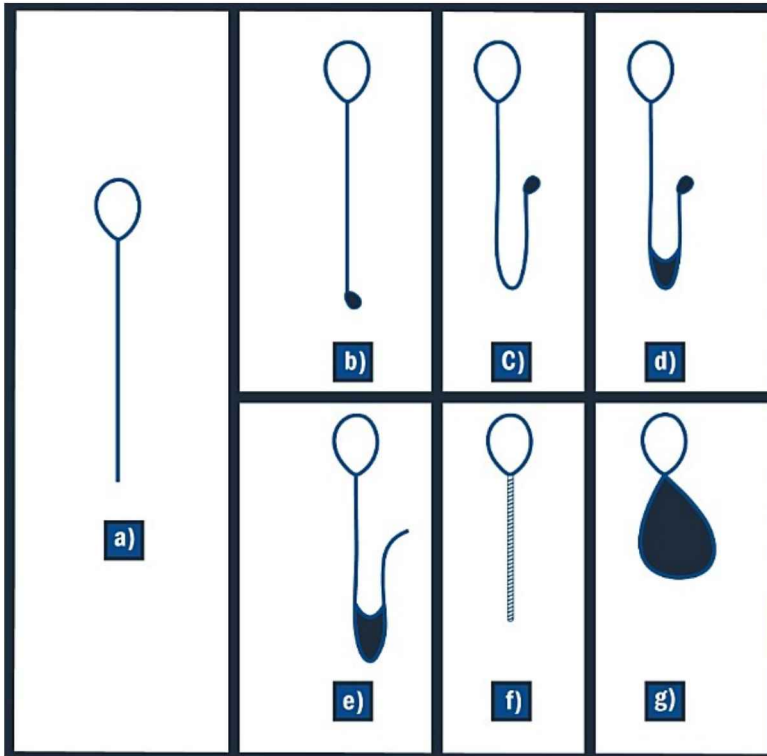
**Figura 11.** Vitalidad espermática (Tinción Eosina-Nigrosina): a) Espermatozoide muerto, b) Espermatozoide vivo.

**IMPORTANTE:** Las cabezas no teñidas de los espermatozoides (blancas) se consideran “vivas”. Las cabezas con tinte rosa, rojo o negro se consideran espermatozoides “muertos” (Figura 11). Existen espermatozoides vivos que muestran solamente cierto tinte rosa en la región del cuello, esto se considera una membrana del cuello con fugas, pero no un signo de muerte celular. Prueba hipo-osmótica para evaluar vitalidad.

La prueba de hinchazón hipo-osmótica (HOS) está basada en el principio de que un espermatozoide vivo mantiene un gradiente osmótico controlado, que al colocarse en un medio de baja molaridad generará la entrada de agua adentro de la célula, provocando la hinchazón de algunas partes del flagelo lo que resulta en el rizado de su cola, mientras que un espermatozoide muerto, presenta hinchazón incontrolada del flagelo hasta el grado de la ruptura de la membrana, resultando en el enderezamiento de la cola (11).

Esta técnica se describe a continuación:

1. Colocar 1 ml de solución hipo-osmótica en un tubo y calentar a 37°C
2. Adicionar una alícuota de 50 µl de semen, mezclar suavemente e incubar a 37°C durante 30 minutos
3. Colocar una alícuota de 10 µl de esta mezcla en un portaobjetos, cubrir con un cubreobjetos de 22x22 mm y dejar reposar durante 1 minuto antes de evaluar.
4. Evaluar al menos 200 espermatozoides con el objetivo de 40x, contando el número de espermatozoide vivos (hinchados) y muertos (colas rectas; Figura 12)
5. Realizar el procedimiento por duplicado y el resultado se expresa en porcentaje de vitalidad.



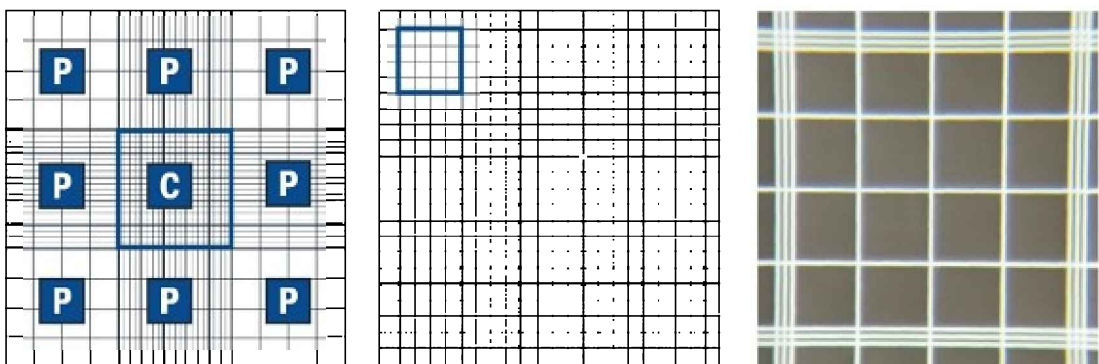
**Figura 12.** Prueba de HOS, a) Espermatozoide muerto, b-h) Espermatozoides vivos.

### Concentración

Para la evaluación de la concentración espermática, la sexta edición del manual de la OMS, así como en ediciones anteriores, recomienda utilizar la cámara de Neubauer. No recomienda cámaras de llenado por capilaridad y de poco volumen en las cuales no se realice dilución de la muestra e inmovilización del espermatozoide (12).

Dependiendo de la dilución y el número de espermatozoides contados, se utilizan diferentes áreas de la cámara de Neubauer para determinar la concentración de espermatozoides.

En general, la cuadrícula central (C) de la cámara de Neubauer se utiliza para contar los 200 espermatozoides, y las ocho cuadrículas periféricas (P), se utilizarán cuando no se cuenten 200 espermatozoides en la C (**Figura 13**).



**Figura 13.** Representación de la cámara de Neubauer. a) Cámara de 100 microlitros de profundidad, cuadrícula central "C" y 9 cuadrículas de 100 nanolitros, b) cuadrícula central que contiene 25 cuadros de 4 nanolitros cada uno. c) Cada cuadro de 4 nanolitros contienen 16 cuadros pequeños de 250 picolitros.

A continuación, mostramos los pasos para la evaluación de la concentración espermática:

**Determinación de la Dilución:**

- 1) Homogenizar la muestra de semen para que la toma de la alícuota sea representativa.
- 2) Tomar 10  $\mu\text{L}$  de semen y observar en objetivo de 40x o 20x.

- 3) Calcular la media de los espermatozoides observados en 3 campos vistos a 40x o 20x
- 4) De acuerdo al promedio de espermatozoides contados en los 3 campos, se realizará la dilución por duplicado de acuerdo a la tabla 2.

**TABLA 2.** Determinación de la dilución de acuerdo con el promedio de espermatozoides observados en los campos microscópicos.

Promedio de espermatozoides contados en 3 campos microscópicos		Dilución	Semen (µl)	Fijador (µl)	Volumen a evaluar	Fórmula Utilizada
Objetivo 40X	Objetivo 20X					
> 200	> 800	1:50 (1 + 49)	50	2450	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 10 spz: contar la cuadrícula central completa (25 cuadros)</li> <li>• 10-40 spz: contar 10 cuadros</li> <li>• &gt; 40 spz contar 5 cuadros</li> </ul>	<b>C= (N/F)</b>
40-200	160-800	1:20 (1 + 19)	50	950		
16-40	64-160	1:10 (1 + 9)	50	450		
2-15	8-64	1:5 (1 + 4)	50	200		
< 2	< 8	1:2 (1 + 1)	100	100		
< 2	< 8	1:2 (1 + 1) Bajas concentraciones	100	100	Cámara completa	<b>C= (N/900)</b>

C= Concentración Espermática; N= Número de espermatozoides contados en ambas cámaras; F= Factor de corrección (determinado por la dilución y el número de cuadros o periferias contadas (Tabla 4)).

**IMPORTANTE:**

- La misma cantidad de cuadros o periferias contadas en la cámara A, se deberá contar en la cámara B.
- Al leer periferias, estas se tendrán que leer completas.
- En bajas concentraciones, cuando el conteo es menor a 25 espermatozoides en cada cámara, la concentración puede ser reportada como <56,000 espermatozoides/ml, con el comentario: "No se pudo determinar la concentración exacta porque se encontraron pocos espermatozoides" (WHO, 2021)

### Instrucciones para el llenado en la cámara de Neubauer:

- 1) Homogenizar las diluciones con un vórtex por 15 segundos.
- 2) Llenar por capilaridad la cámara Neubauer respectivamente (se recomienda 10 µl para cada dilución).
- 3) Colocar la cámara de Neubauer en ambiente húmedo durante 10 a 15 minutos en posición horizontal.
- 4) Evaluar al menos 200 espermatozoides por duplicado utilizando objetivos de 20x o 40x.

### Procedimiento para el conteo en la cámara Neubauer:

- 1) Utilizar óptica de contraste de fases con un aumento de 20x o 40x. Evaluar primero la cuadrícula central "C" ubicando el cuadro superior izquierdo con capacidad de 4 nl.
- 2) De acuerdo con el número de espermatozoides observados en el cuadro superior izquierdo de la cuadrícula central "C", se decidirá cuantos cuadros se analizarán para el conteo, de acuerdo a lo siguiente:
  - <10 espermatozoides observados, se contarán 25 cuadros (cuadrícula C),
  - 10-40 espermatozoides observados, se contarán 10 cuadros (cuadrícula C).

- >40 espermatozoides observados, se contarán 5 cuadros (cuadrícula C).
- 3) El mismo número de cuadros o cuadrículas que se cuente en la cámara A, se deberá contar en la cámara B.
- 4) Para bajas concentraciones se debe de contar toda la cámara de Neubauer (área completa)

#### **Sumatoria y diferencia de los dos conteos:**

- 1) Se deberán comparar los conteos de la cámara A y la cámara B para contrastar con lo establecido en las tablas de las diferencias máximas aceptables para dicho procedimiento.
- 2) Verifique en la tabla 3 (sumatoria y diferencias de los conteos), si es aceptable la diferencia entre los dos conteos de las diluciones. Si es aceptable, sustituir los valores con la fórmula correspondiente.
- 3) La concentración espermática se expresa en millones de espermatozoides/ml de semen. La cantidad total de espermatozoides en la muestra de semen se obtiene multiplicando la concentración espermática por el volumen del eyaculado, y se expresa en millones de espermatozoides.

**IMPORTANTE:** El Factor de Corrección (Volumen por duplicado x Factor de Dilución), es la suma de los dos recuentos de réplicas aceptados se divide por un factor que está determinado por la dilución y el número de cuadrados (4 nl) o cuadrículas (100 nl) evaluados en ambas cámaras de recuento (Tabla 4).

**TABLA 3.** Comparativas de las diferencias máxima de la suma de dos conteos. Si la diferencia encontrada entre los conteos de réplicas es menor o igual al límite de diferencia en la columna a la derecha del rango de sumas, puede aceptar las evaluaciones de réplicas y calcular el resultado final. La tercera columna da una indicación de la incertidumbre del resultado final basado en el número de observaciones (número de espermatozoides evaluados).



RANGOS DE SUMA	DIFERENCIA MÁXIMA ACEPTABLE	ERROR DEL RESULTADO FINAL BASADO EN EL NÚMERO DE OBSERVACIONES	RANGOS DE SUMA	DIFERENCIA MÁXIMA ACEPTABLE	ERROR DEL RESULTADO FINAL BASADO EN EL NÚMERO DE OBSERVACIONES	RANGOS DE SUMA	DIFERENCIA MÁXIMA ACEPTABLE	ERROR DEL RESULTADO FINAL BASADO EN EL NÚMERO DE OBSERVACIONES	RANGOS DE SUMA	DIFERENCIA MÁXIMA ACEPTABLE	ERROR DEL RESULTADO FINAL BASADO EN EL NÚMERO DE OBSERVACIONES
969-1000	61	3.2%	528-550	45	4.4%	219-234	29	6.8%	44-51	13	15.1%
938-968	60	3.3%	504-527	44	4.5%	206-218	28	7.0%	38-43	12	16.2%
907-937	59	3.3%	482-503	43	4.6%	190-205	27	7.3%	32-37	11	17.7%
876-906	58	3.4%	460-481	42	4.7%	176-189	26	7.5%	27-31	10	19.2%
846-875	57	3.4%	438-459	41	4.8%	163-175	25	7.8%	22-36	9	21.3%
817-845	56	3.5%	417-437	40	4.9%	150-162	24	8.2%	17-21	8	24.3%
788-816	55	3.6%	396-416	39	5.0%	138-149	23	8.5%	13-16	7	27.7%
760-787	54	3.6%	376-395	38	5.2%	126-137	22	8.9%	10-12	6	31.6%
732-759	53	3.7%	357-375	37	5.3%	115-125	21	9.3%	7-9	5	37.8%
704-731	52	3.8%	338-356	36	5.4%	105-114	20	9.8%	5-6	4	44.7%
678-703	51	3.8%	319-337	35	5.6%	94-104	19	10.3%	3-4	3	57.7%
651-677	50	3.9%	301-318	34	5.8%	85-93	18	10.8%	2	2	70.7%
625-650	49	4.0%	284-300	33	5.9%	76-84	17	11.5%	1	1	100.0%
600-624	48	4.1%	267-283	32	6.1%	67-75	16	12.2%			
576-599	47	4.2%	251-266	31	6.3%	59-66	15	13.0%			
551-575	46	4.3%	235-250	30	6.5%	52-58	14	13.9%			

La fórmula para la obtención de la concentración espermática es:  $C=N/F$  donde:

C= Concentración Espermática

N= Sumatoria de los dos conteos de la cámara de Neubauer.

F= Factor de corrección (volumen del área contada por duplicado x factor de dilución).

**Tabla 4.** Obtención del factor de corrección.

Dilución	Número de cuadros contados en la cuadrícula central (5)			Número de cuadrículas contadas en la cámara de Neubauer							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
	<b>Factor de Corrección</b>										
1:2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900
1:5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1:10	4	8	20	40	60	80	100	120	140	160	180
1:20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1:50	0.8	1.6	4	8	12	16	20	24	28	32	36

**Fórmula para utilizar con una dilución 1:2 para baja concentración espermática**

1) Identificar las áreas contadas de la cámara de Neubauer.

2) Si se contaron 9 cuadrículas de 100 nl (conteo de toda la Cámara), la fórmula a utilizar es:  $C = N/900$  dónde:

C: Concentración Espermática

N= Sumatoria de los dos conteos de la cámara de Neubauer.

900= Factor de corrección (volumen del área contada por duplicado x factor de dilución).

## Morfología

La morfología del espermatozoide ha sido considerada uno de los principales predictores de su capacidad fecundante, pues se ha observado que los gametos con una buena conformación tienen mejor cinética y mayores posibilidades para unirse a la zona pelúcida de un ovocito homólogo (13,14).

### Espermatozoide Ideal

La cabeza debe poseer una longitud de 4 a 5  $\mu\text{m}$ , un ancho de 2,5 a 3,5  $\mu\text{m}$ , pudiendo presentarse pequeñas diferencias según la tinción utilizada. El acrosoma debe verse definido como una zona clara que comprende al 40 a 70% de la cabeza. No debe observarse anomalías en el cuello o la cola. Si tiene residuo citoplasmático debe ser menor a 1/3 del tamaño de la cabeza del espermatozoide.

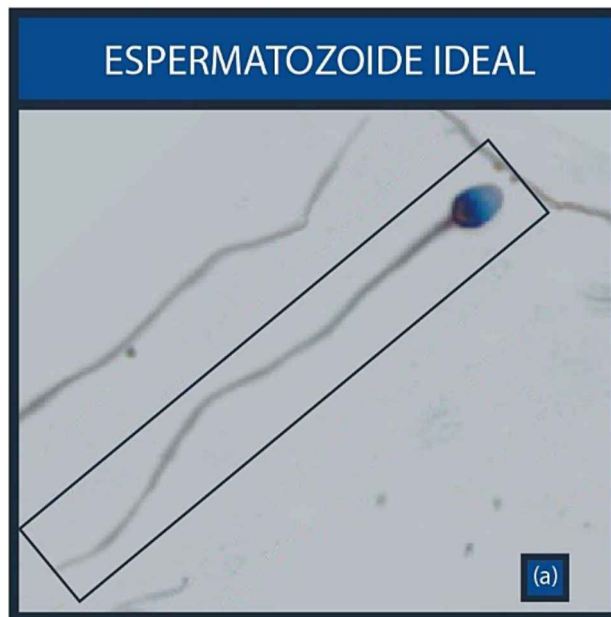


Figura 14. Forma ideal del espermatozoide (Tinción Papanicolaou).

### Anormalidades

De acuerdo con las diferencias en tamaño, estructura y forma, las anomalías se pueden clasificar en las siguientes cuatro categorías:

- **Anormalidades de cabeza:** Esta categoría incluye las cabezas piriformes, grandes, pequeñas, alargadas (tapering), amorfas, redondas (pueden no tener acrosoma), dobles, vacuoladas (más de

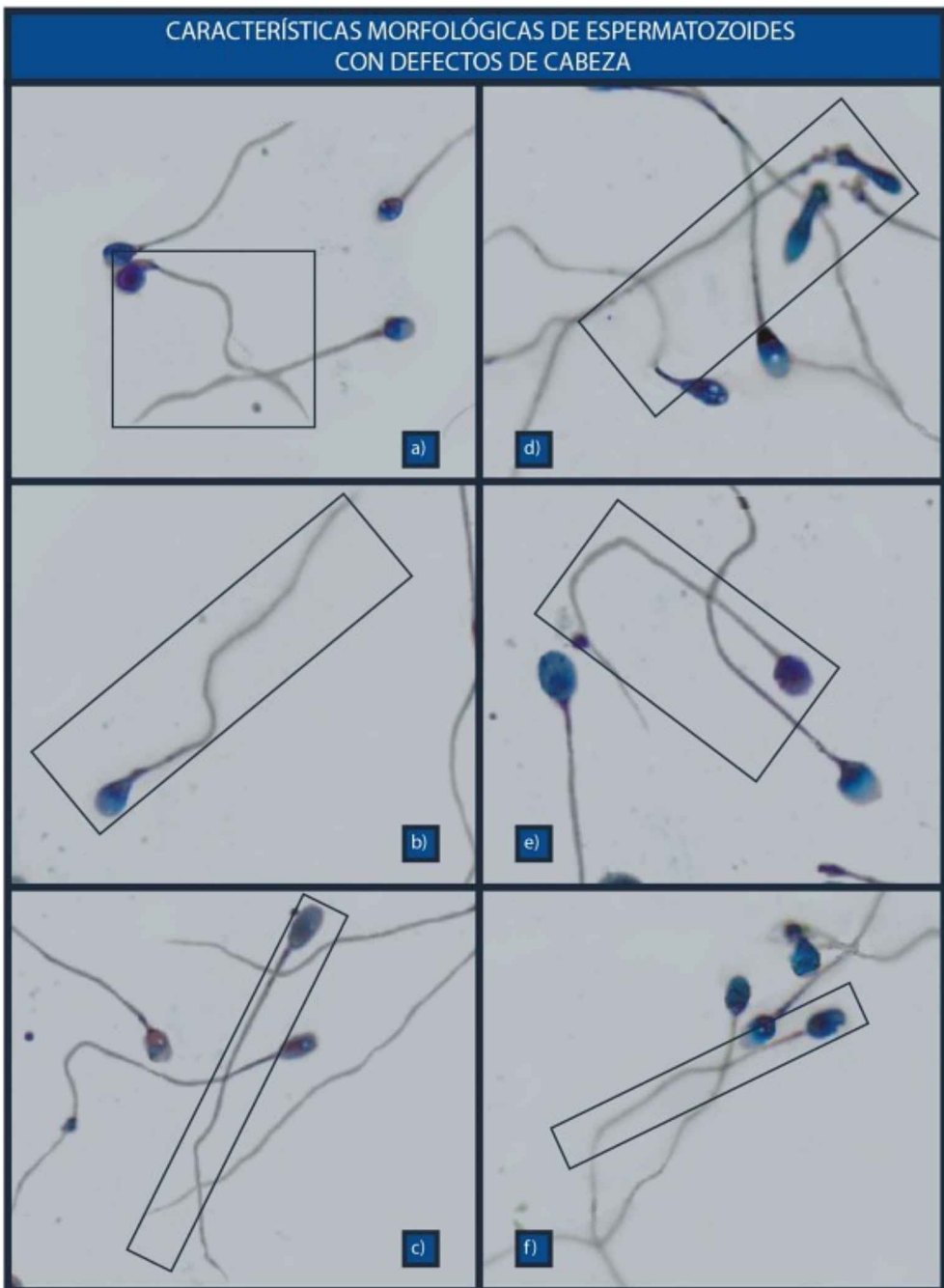
2 vacuolas), acrosoma pequeño (menos del 40% de la superficie de la cabeza), acrosoma grande (más del 70% de la superficie de la cabeza).

- **Anormalidades de pieza media y cuello:** En esta categoría se encuentran los espermatozoides con mala inserción de la pieza media (la cual forma un ángulo de 90° con el eje de la cabeza), puede estar engrosada, o delgada.

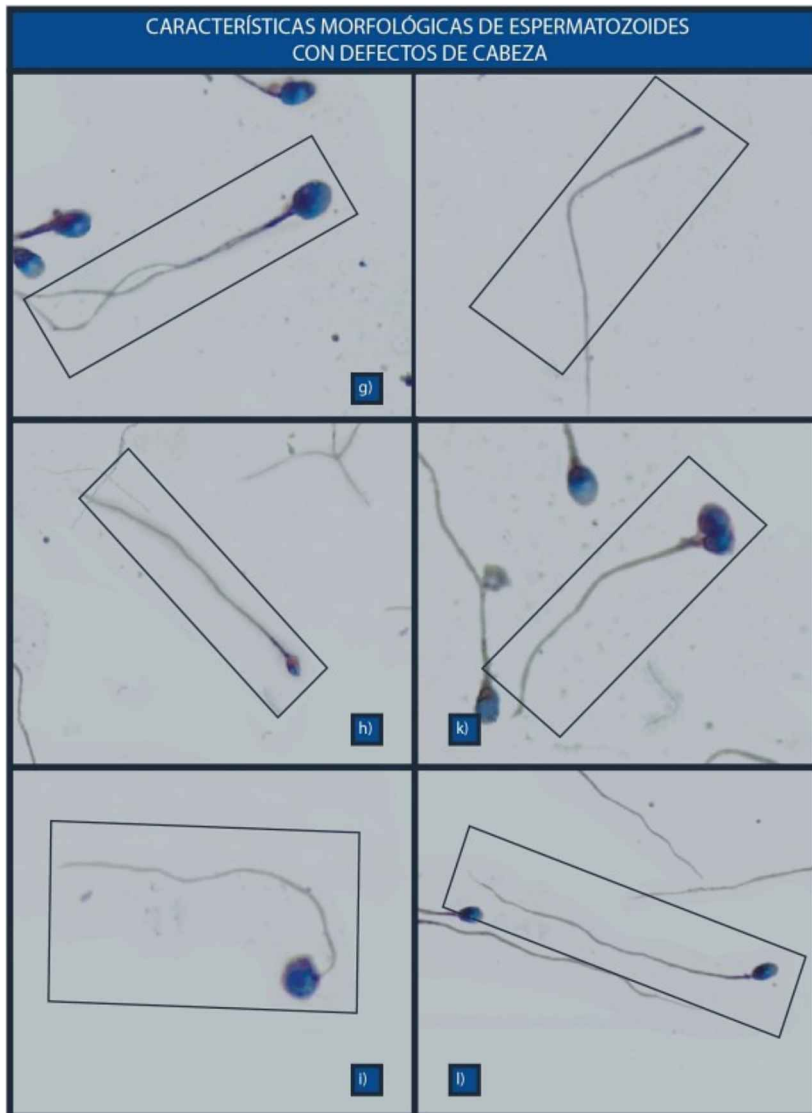
- **Anormalidades de cola:** El flagelo o cola se puede presentar quebrada, enrollada, irregular o doble, también se pueden presentar anomalías combinadas.

- **Exceso de residuo citoplasmático:** Para ser considerada una anomalía debe tener un tamaño mayor a 1/3 de la cabeza del espermatozoide y puede verse a nivel de la pieza media o en la cola.

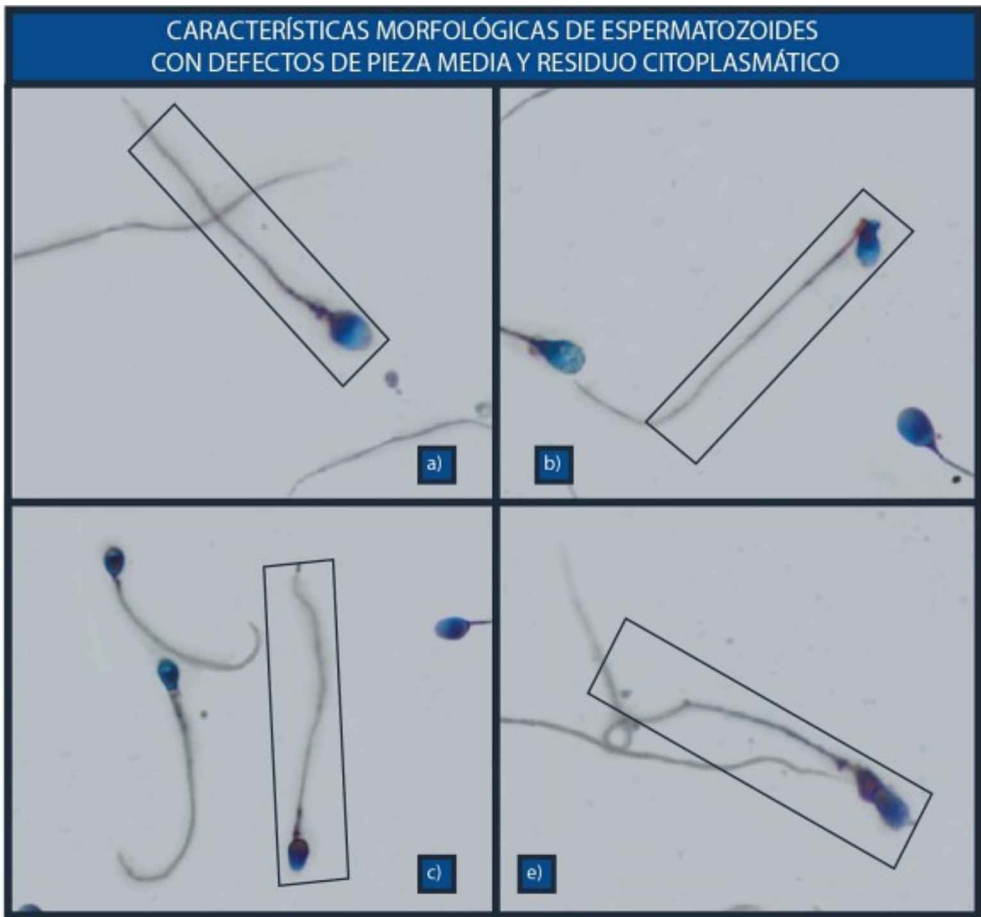
En las Figuras 15-18 se observan las diferentes formas de los espermatozoides.



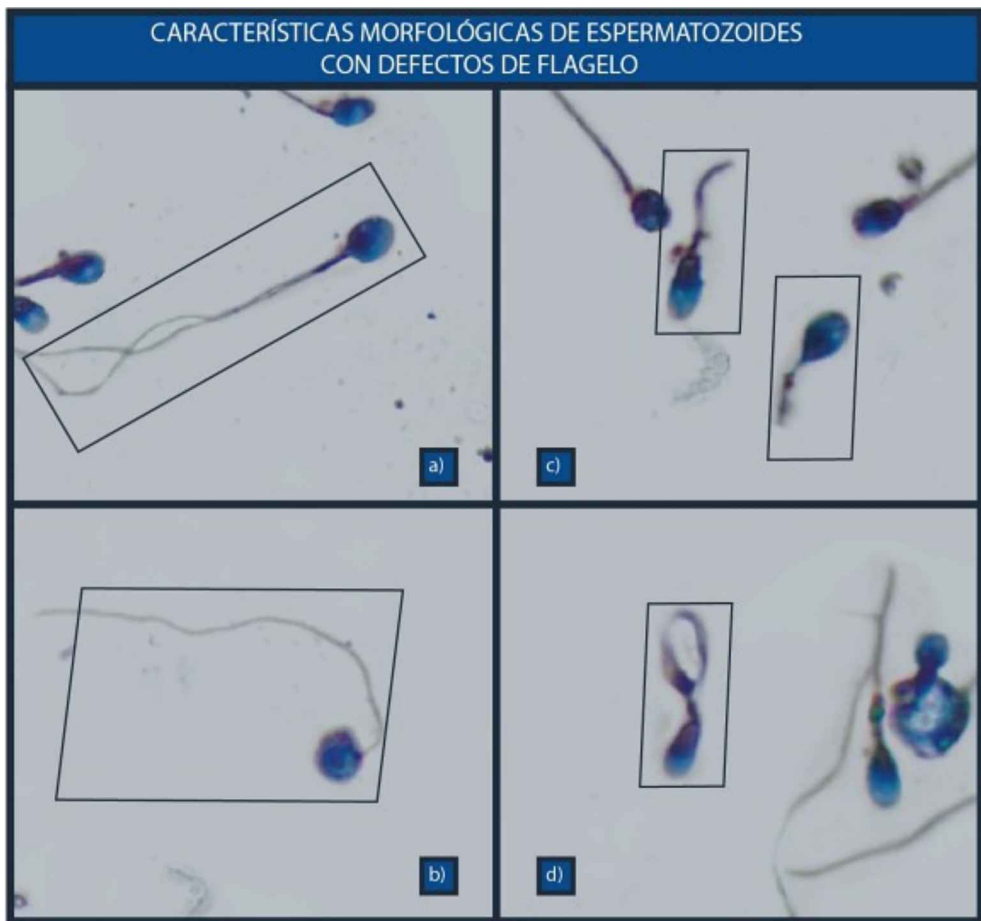
**Figura 15.** Espermatozoides con anomalías en cabeza (Tinción Papanicolaou): a) Amorfo, b) Piriforme, c) Cabeza elongada d) *Tapering* e) Acrosoma pequeño, f) Superficie irregular.



**Figura 16.** Espermatozoides con anomalías en cabeza (parte 2, Tinción Papanicolaou): g) Macrocéfalo, h) Microcéfalo, i) Cabeza redonda, j) Cabeza de alfiler, k) Doble cabeza, l) Cabeza vacuolada.



**Figura 17.** Espermatozoides con anomalías de pieza media (Tinción Papanicolaou): a) Pieza media ancha, b) Doblada, c) Inserción asimétrica, d) Residuo citoplasmático.



**Figura 18.** Espermatozoides con anomalías en flagelo (Tinción Papanicolaou): a) Doble flagelo, b) Delgado, c) Corto d) Enrollado.

### Tinciones

Primeramente, se debe de realizar un extendido. Se toma una alícuota de 10  $\mu$ l (dependiendo de la concentración) y debe ser depositada sobre un portaobjetos limpio. Se puede extender con la ayuda de otro portaobjeto y se debe dejar secar completamente antes de realizar la fijación y la tinción.

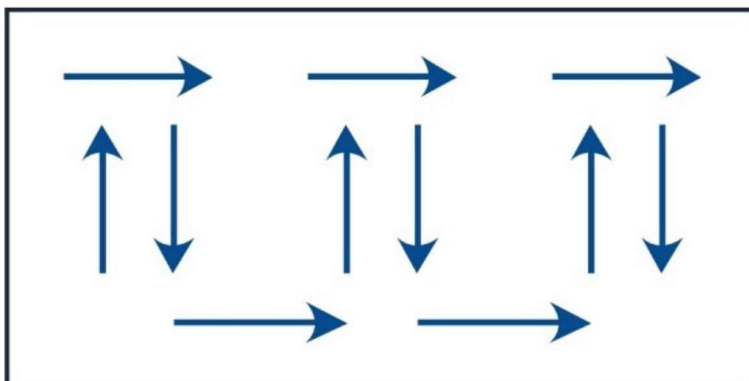
La tinción de Papanicolaou es la más recomendada por el reciente manual de la OMS, sin embargo, también recomienda procedimientos de cito-coloración más rápidos, de dos o tres tiempos y otros como la tinción de Shorr. La tabla 5 muestra estas tinciones:

**TABLA 5.** Métodos de tinción para la evaluación de la morfología espermática.

TINCIÓN	PROCEDIMIENTO
Papanicolaou	Etanol 80° - 30 segundos Etanol 50° - 30 segundos Lavar con H <sub>2</sub> O - 30 segundos Hematoxilina de Harris - 4 minutos Lavar con H <sub>2</sub> O - 30 segundos Etanol acídico - 4 a 8 inmersiones Lavar con H <sub>2</sub> O - 30 segundos Lavar con agua corriente por goteo - 5 minutos Etanol 50° - 30 segundos Etanol 80° - 30 segundos Etanol 95° - 15 - 20 minutos Orange G-6 - 1 minuto Etanol 95° - 30 segundos Etanol 95° - 30 segundos Etanol 95° - 30 segundos Green EA-50- 1 minuto Etanol 95° - 30 segundos Etanol 95° - 30 segundos Etanol 100% - 15 segundos Etanol 100% - 15 segundos Xileno
Shorr	Sumergir las placas en etanol 75° - 1 hora Lavar en agua corriente - 12 a 15 inmersiones Hematoxilina de Harris - 1 - 2 minutos Lavar con agua corriente - 12 a 15 inmersiones Etanol amoniacal - 10 inmersiones Lavar con agua corriente - 12 a 15 inmersiones Etanol 50° - 5 minutos Tinción de Shorr - 3 a 5 minutos Etanol 50° - 5 minutos Etanol 75° - 5 minutos Etanol 95° - 5 minutos
Diff-Quik	Sumergir en solución fijadora (Diff-Quik fix) - 15 segundos (o sumergir en metanol al 95% durante 1 hora ) Dejar secar al aire Solución de tinción I (Diff-Quick I) - 10 segundos Solución de tinción II (Diff-Quick II) - 15 segundos Lavar con agua corriente 10 a 15 veces Dejar secar al aire Montaje

Evaluación de los extendidos

Evaluar al menos 200 espermatozoides con microscopía clara a 100x, utilizando aceite de inmersión. (3; Figura 19)



**Figura 19.** Esquema de la forma como debe realizarse la evaluación, con la finalidad de no hacer conteos repetidos de las mismas células (usualmente llamada guarda griega).

Con ayuda de un contador de células mecánico se distinguen los espermatozoides normales y anormales (**Figura 20**).

Los resultados se deben expresar de la siguiente manera:

- Porcentaje de espermatozoides normales y anormales
- Porcentaje de anomalías de cabeza, pieza media, cola y exceso de residuo citoplasmático.

Evaluar al menos 200 espermatozoides por extendido. Es necesario utilizar contadores mecánicos que contengan varias teclas, para cada una de las características de morfología a evaluar. Estas son: "normales", defecto de cabeza, defecto de pieza media, defecto de flagelo o cola y exceso de residuo citoplasmático.

Utilizando un contador mecánico, cada vez que se evalúa 1 espermatozoide será contado como 1 en el recuento total, pero si es 2anormal, se podrán ingresar hasta 4 anomalías al mismo tiempo (presionando las 4 teclas simultáneamente), mientras que solo se habrá registrado 1 espermatozoide.



**Figura 20.** Contador de células mecánico; permite el conteo de espermatozoides individuales con sus diferentes anomalías.

### Índice de teratozoospermia (TZI)

El Índice de Teratozoospermia (TZI, por sus siglas en inglés), consiste en calcular el grado de deformidad de un determinado espermatozoide anormal, considerando que cada espermatozoide anormal puede tener defectos en la cabeza, pieza media, cola o exceso de residuo citoplasmático. Esto deriva en que por cada espermatozoide anormal podemos como máximo tener cuatro anomalías.

Este índice se calcula como el número total de anomalías dividido por el número de espermatozoides anormales y puede variar de 1 (que implica que cada espermatozoide considerado anormal solo presentaba un defecto) a 4 (que implica que cada espermatozoide considerado anormal presentaba 4 defectos).

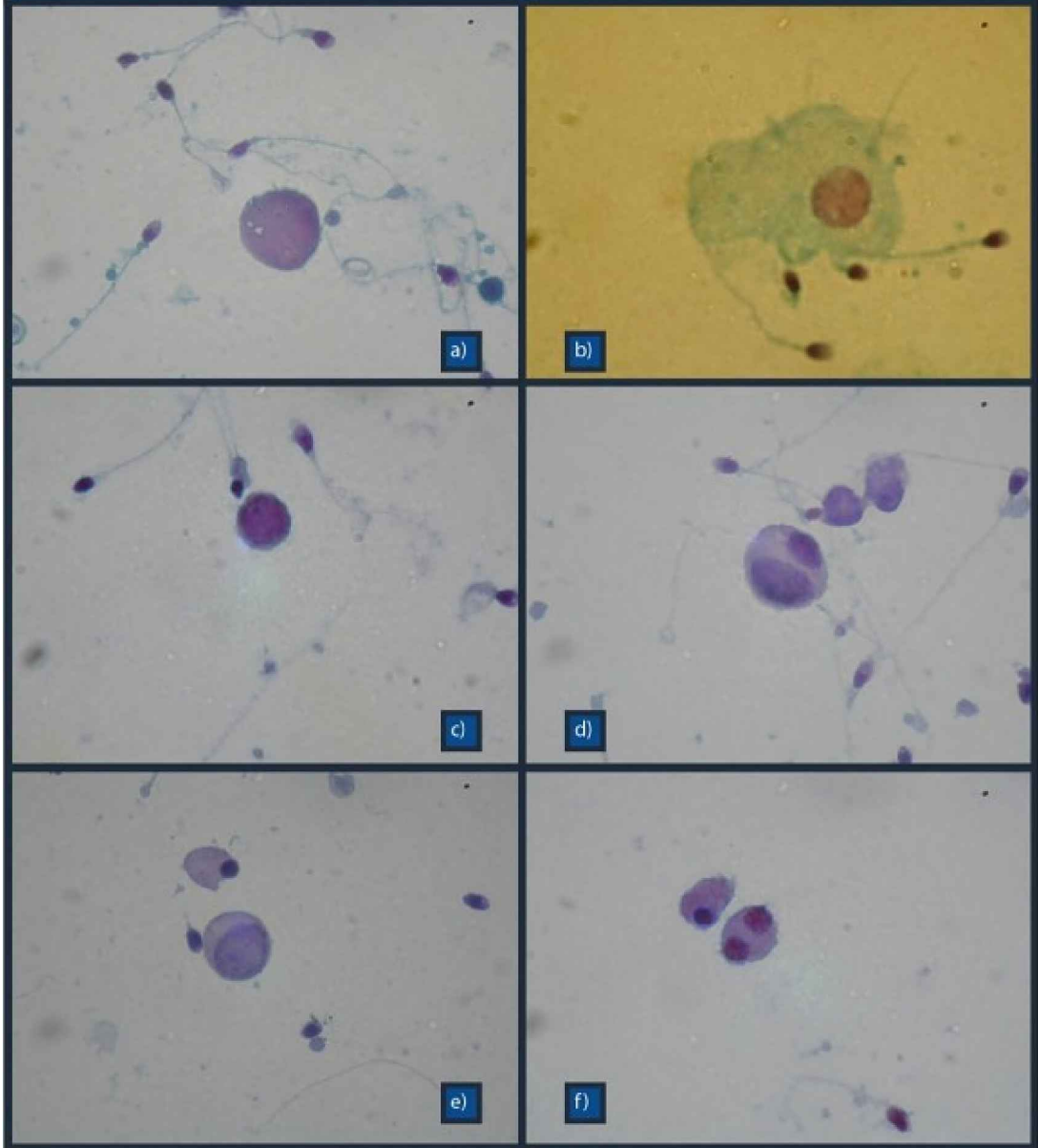


### **Otras células presentes en el semen**

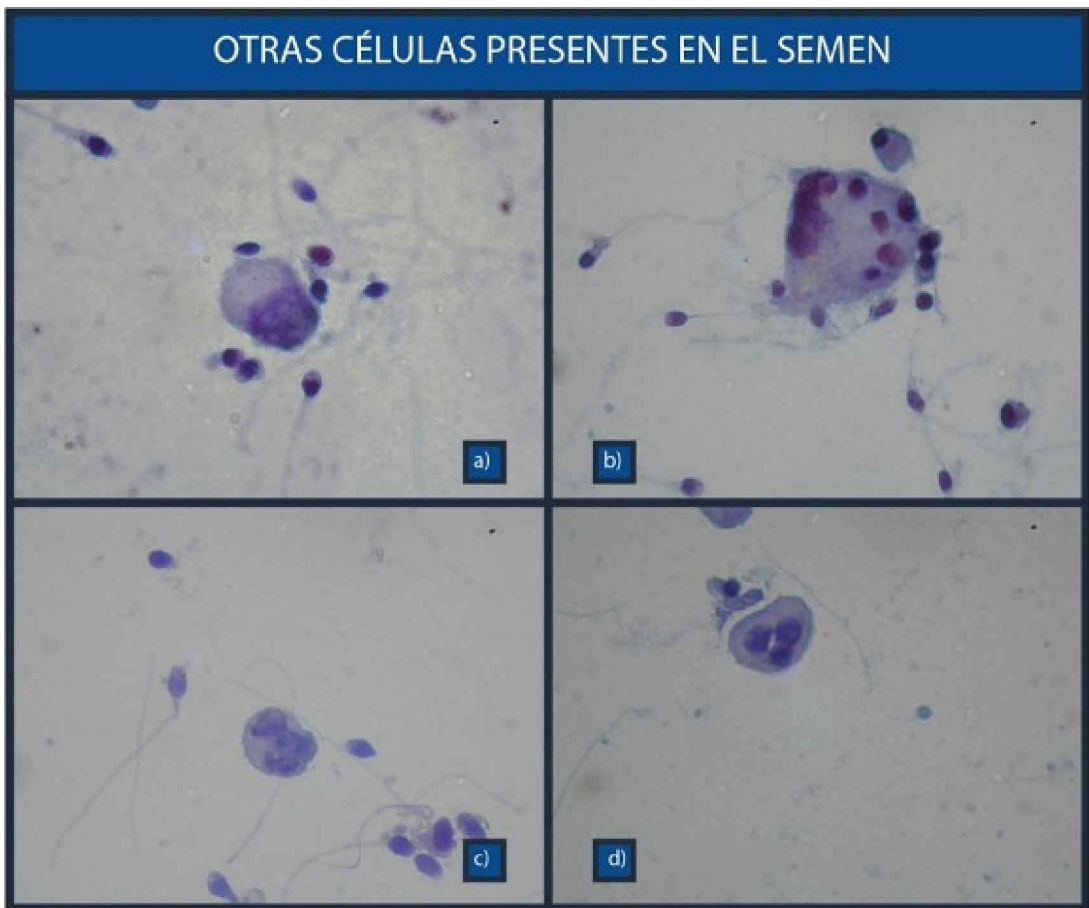
En el semen, además de espermatozoides, pueden estar presentes células derivadas del proceso espermatogénico que se desarrolla en los testículos, y que son precursoras de los espermatozoides, por ello se conocen como células inmaduras o germinales; entre ellas se encuentran las espermátidas, espermaticitos y rara vez espermatogonias (**Figuras 21 y 22**). También se pueden encontrar leucocitos en el semen, con predominio de neutrófilos (16), sin embargo, un número excesivo de estas células (superiores a 1 millón/ml) sugiere la existencia de una infección y pobre calidad del semen (3). Para distinguir a los leucocitos, (principalmente polimorfonucleares), de las formas inmaduras (espermátidas y espermaticitos), se utiliza la tinción de Papanicolaou ó Diff-Quick (16).

Las células epiteliales en el semen tienen relación con el funcionamiento e integridad de las estructuras del aparato reproductor masculino. Las actividades proliferativas y secretoras de las glándulas explican la presencia de este tipo de células en el semen, sin embargo, tomando en cuenta los criterios citológicos de los tipos celulares ya mencionados, el exceso de epiteliales en el líquido seminal refleja una proliferación excesiva o descamación anormal, de las láminas basales de los endotelios involucrados (17).

## OTRAS CÉLULAS PRESENTES EN EL SEMEN



**Figura 21.** Células redondas presentes en el semen: a) Citoplasma b) Célula epitelial, c) Espermatogonia de tipo B, d) Espermatocito primario e) Espermatocito secundario, f) Espermátida.



**Figura 22.** a) Macrófago, b) Macrófago fagocitando espermatozoides, c) Monocito, d) Polimorfonuclear.

### Cálculos

La concentración de las células presentes en el semen (diferentes a los espermatozoides), puede ser calculada realizando el conteo de los diferentes tipos celulares (inmaduras, epiteliales o leucocitos) al mismo tiempo en que se realiza la evaluación de la morfología espermática (3) aplicando la siguiente fórmula:

$$C = S \times N/200$$

Donde:

**C**= Concentración de células redondas en millones / ml

**S**= Concentración de espermatozoides en millones / ml

**N**= Número de células redondas contadas entre 200 espermatozoides.

### Control de calidad en el análisis seminal

El análisis básico de semen es un estudio que por su naturaleza presenta una alta variabilidad en sus resultados, ya sea dentro del mismo laboratorio o entre diferentes laboratorios que llevan a cabo este análisis, esto es un problema que acarrea incertidumbre para el médico que trata al paciente. La amplia variación que presenta el análisis de semen es debida al error humano y a la falta de estandarización. (18,19).

Pese a que dicho estudio es realizado con instrumentos volumétricos exactos, los parámetros como la movilidad y la morfología espermática revisten una gran subjetividad en sí mismos y es común encontrar diferencias entre los resultados (20,21). Este problema seguirá

sucediendo si no se cuenta con un apropiado control de calidad que pueda detectar y corregir los errores que provocan la alta variabilidad dentro y fuera del laboratorio.

Tomando como referencia lo anterior, es necesario que los laboratorios implementen sistemas de calidad que detecten y corrijan los errores en el análisis de semen, disminuyan los costos que provoca la no calidad, trayendo consigo la mejora continua al sistema global del laboratorio.

El control de calidad interno (CCI) se refiere a todas las actividades de calidad que se realizan dentro de un laboratorio. Las tres fases del control de calidad interno son: fase preexamen, fase examen y fase post examen. En dicho control se mide la variabilidad en los resultados obtenidos, como la diferencia sistemática o aleatoria entre diferentes operarios, siendo de gran utilidad para detectar la precisión.

La fase preexamen, es el filtro de entrada de la prestación del servicio; pero que conlleva diversas actividades específicas como la preparación del paciente basado en indicaciones claras y precisas, sujetos a evaluación periódica. La fase examen se refiere al análisis de las muestras bajo estricto control de calidad que incluye la capacitación y actualización del personal operativo, la calibración de equipos de medición y apoyo, la calidad de los insumos, entre otros. La fase post examen, valida el resultado obtenido en la fase analítica.

Respecto al control de calidad, la fase analítica cobra mayor relevancia, ya que es la parte que asegura el análisis de la muestra y para ello, es importante que el operario conozca todos los aspectos involucrados en el análisis seminal, considerando los factores del medio interno y externo (Figura 23). Tómese en cuenta que la calidad del proceso asegura el éxito (22).

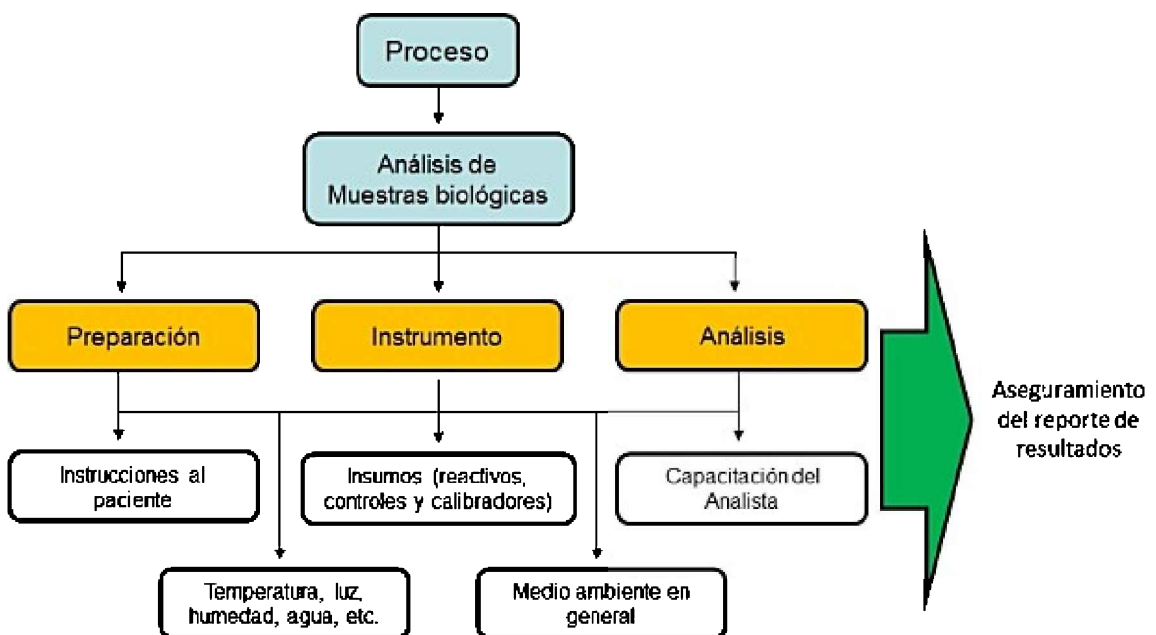


Figura 23. Fase examen del control de calidad (Fuente: M.I.C. Sergio A. González Ortiz).

La evaluación externa de la calidad (EEC) es una parte integral del proceso de control de calidad, para lo cual existe un variado número de esquemas formales que permiten llevarlo a cabo (19,21). La EEC es importante para la valoración de los efectos de la estandarización de los procedimientos, permitiendo que un grupo de laboratorios pueda comparar sus resultados con los demás.

En resumen, el control de calidad interno en el laboratorio de andrología, sólo se podrá lograr, si la calidad en cada paso del proceso de recepción, análisis y evaluación de la muestra es óptima. Aunado a lo anterior, debe tenerse muy claro que el CCI no sustituye al EEC, ambos controles deben estar vigentes, ya que se logra detectar, entre otros, fallas en equipos, materiales, reactivos; deficiencia de los procedimientos o falta de ellos; establecimiento de indicadores, así como de medidas preventivas y correctivas de forma oportuna. De tal forma que el aseguramiento

de la calidad es la base para ofrecer un servicio confiable a los usuarios, principalmente porque el análisis de semen es excepcionalmente complicado y difícil de estandarizar (3,23 y 24).

Es importante que las muestras de control de calidad se analicen como parte del trabajo de laboratorio de rutina y no sean tratados de forma especial. Los tipos de material utilizados para monitorear en persona (refiriéndose a la consistencia en la lectura de una sola persona del mismo tipo de muestra) y entre técnicos (refiriéndose a la consistencia entre la lectura o interpretación de dos o más personas de la lectura de la misma muestra) la variación puede adquirirse de fuentes comerciales o fabricarse en el laboratorio.

La fase post examen, se refiere a la emisión del resultado del análisis básico del semen en la que es necesario atender y corregir los posibles errores que se presentan, entre ellos:

- a) *Errores en el cálculo de magnitudes biológicas.* Estos errores se generan cuando algunos valores se calculan a partir de otros, como sucede en el laboratorio clínico al calcular el valor de la bilirrubina indirecta, la cual es el resultado de restar a la bilirrubina total, el valor de la bilirrubina directa. Si alguna de las dos magnitudes es incorrecta, evidentemente el resultado final será incorrecto. De aquí la relevancia de mantener un buen programa de control de calidad interno en todas sus fases. En la actualidad, los equipos determinan estas diferencias; pero el análisis básico del semen sigue siendo manual, por lo que debe tenerse cuidado en el cálculo que corresponda, el cual debe estar libre de errores y en caso de discrepancias o dudas, repetirlos, especialmente cuando se obtienen resultados muy alejados del intervalo de referencia.
- b) *Errores en la transcripción del resultado.* En el pasado, la mayor parte de los errores se debía a la transcripción manual de resultados. En la actualidad, el uso de equipos interfazados ha permitido la disminución de estos errores, considerando que la programación y configuración de los equipos sea la correcta. No obstante, en el análisis seminal, el procedimiento continúa siendo manual, por lo que el operario debe tener especial cuidado en la transcripción de resultados, considerando la existencia de formatos de registro durante el análisis de las muestras en la fase examen, que le permitan validar la información al final de todo el proceso.
- c) *Errores en la comunicación de valores de alerta.* Un valor de alarma es un valor que señala una condición especial en el paciente que puede poner en riesgo su vida, o no. En el laboratorio clínico, un valor de alarma puede ser un valor alto de glucosa, de bilirrubinas o de algún otro componente que ponga en riesgo la vida del paciente y que debe ser comunicado inmediatamente. En el laboratorio de andrología, es muy poco probable la existencia de valores de alarma que signifiquen riesgo para el paciente, lo más que puede reportarse significativamente es un diagnóstico de infertilidad. De forma general, se recomienda registrar estos valores, los datos del paciente, el operario que proceso la muestra y la fecha de procesamiento.
- d) *Errores en el cumplimiento de los tiempos de respuesta.* Cada examen de laboratorio presenta características únicas, como el tiempo que en debe determinarse algún componente biológico, desde su recepción en el laboratorio. Por ello, no es de esperarse que se tomen los tiempos de llegada de las muestras al laboratorio, pues tan sólo para registrar el tiempo de licuefacción, la muestra de semen debe observarse cada 10 minutos hasta que la muestra este licuada. El incumplimiento de dichos tiempos de respuesta es una de las causas principales de errores en el laboratorio de andrología.  
Se recomienda que exista un documento con estos datos registrados de manera accesible a todo el personal del laboratorio clínico, de manera que todo el personal sea consciente de la necesidad de cumplimiento de estos tiempos de respuesta, de los cuales es recomendable una revisión periódica, como sucede en el laboratorio de urgencias, dónde el tiempo de respuesta debe ser prioritario.

- e) *Errores en la interpretación de resultados.* Por lo regular, existen errores en la interpretación de los resultados que realiza el médico solicitante. En este sentido, es deber del laboratorio elaborar un informe que facilite la interpretación de los resultados que presenta. Existen diferentes estrategias para facilitar la interpretación, cómo definir el orden adecuado de aparición de las magnitudes biológicas, disponer de correctos valores de referencia o valores discriminantes, comentarios interpretativos en los casos en los que sea necesario como por ejemplo los análisis genéticos, símbolos al lado de las magnitudes que se encuentren fuera del intervalo de referencia, etc (25).

Es recomendable que las hojas de reporte y el resto de los formatos, se mantengan en resguardo en el área de análisis, limpios y libres de borrones, marcas, tachaduras o enmendaduras, con señalamiento especial aquellos valores que representen un valor anormal o fuera de rango. De igual forma, los comentarios, sugerencias o recomendaciones son importantes, pues orientan al operario sobre el desarrollo del procedimiento y manejo de la muestra, debiendo recordar que el laboratorio de andrología no emite diagnóstico, pues ello compete al médico tratante (26).

Por último, los cambios en las prácticas de control de calidad no siempre son fáciles de implementar debido a los paradigmas, “así lo hemos hecho siempre” o “lo hacemos a la antigua”. Estas prácticas perjudican el desarrollo de la prueba y retrasan el procedimiento. En este sentido, los directores, coordinadores o jefes de laboratorio, así como los gestores de calidad y personal operativo, debería tomar en consideración toda la información generada en sus áreas de trabajo, ya que son responsables de la implementación de procedimientos y por consecuencia de planes de calidad para el mejor desarrollo de las pruebas. No obstante, la mayoría de las veces sólo el gestor de la calidad conoce las fallas y aunque las dé a conocer, permanece sólo en un sistema de calidad deficiente sea por la actitud negativa o conformismo del personal del laboratorio (27), dejando de lado diversas actividades que afectan la calidad del procedimiento, como el registro de no conformidades (28).

### **Estandarización del análisis del semen en Latinoamérica**

En el 2005 el Biol. Gerardo Cerezo fue profesor del curso: Estandarización del análisis de semen humano, organizado por la Asociación Mexicana de Andrología (AMA) en la Ciudad de México con la finalidad de estandarizar los criterios de la OMS. Después del curso que organizó la AMA en 2005, hemos organizado y participado en más de 150 cursos de análisis de semen en México, en colaboración con asociaciones, colegios, universidades, instituciones de salud, empresas, etc. con el fin de estandarizar este estudio.

Por otro lado, a finales del 2008, un grupo de especialistas Latinoamericanos del área de andrología, creamos el Programa Latinoamericano para la Estandarización del Análisis Seminal (PLEAS). El PLEAS fue conformado por: Luis Sarabia (Chile), Ricardo Gutiérrez (Colombia), Gerardo Cerezo (México), Roger Iziga-Goicochea (Perú), Ricardo Lozano (Venezuela), Carlos Ortiz (Nicaragua) y María José Munuce (Argentina).

El PLEAS se presentó durante la XXI reunión bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH) llevada a cabo en São Paulo, Brasil, en abril de 2009, en un simposio dedicado al PLEAS, y se acordó iniciar un trabajo amplio y en colaboración con todos los países latinoamericanos. La estandarización del ABS es una necesidad urgente en Latinoamérica.

Para ayudar a esta estandarización, es importante comentar que en el 2021 se publicó la primera norma internacional para el examen básico del semen: ISO23162: 2021, mediante un grupo de trabajo liderado por el Dr. Lars Björndahl. Esta norma especifica los requisitos mínimos para el equipo y los aspectos críticos de los métodos de prueba para las mejores prácticas en laboratorios, que realizan exámenes básicos de semen humano recolectado por eyaculación, y también a la preparación de muestras para el análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA).

La **norma ISO23162:2021** nos ayudará a asegurar resultados confiables y facilitará a los laboratorios la acreditación para el análisis de semen humano (29).

### **Conclusiones**

A pesar de las nuevas tecnologías en medicina reproductiva, el ABS sigue siendo un estudio necesario para evaluar la fertilidad del hombre. Establecer los estándares mundiales de este procedimiento en los laboratorios de andrología, constituye un reto importante, ya que se requiere realizar análisis que produzcan resultados confiables que sirvan como apoyo en la práctica médica, proporcionando con ello, una herramienta más para ofrecer a las parejas infértiles que buscan algún tratamiento.

La reciente publicación del manual de la OMS y la nueva norma ISO, ayudarán a lograr esta estandarización del ABS en los laboratorios.

Es importante que los laboratorios de Latinoamérica estandaricen este estudio de acuerdo con los lineamientos mundiales y controles de calidad internos y externos. Sí se siguen estas directrices, los estudios y datos de nuestras investigaciones, serán importantes y de utilidad clínica para ser tomados en cuenta en las nuevas publicaciones del manual OMS.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Química Ana María Medina de la Rosa por su gran apoyo en el diseño de las imágenes de este capítulo.

## Referencias

1. Björndahl L. Importancia de la estandarización global del análisis básico de semen. En: Cerezo PG., editor. Manual para el análisis básico de semen: Una guía práctica. México: Prado, 2014; Pp 1-157
2. Harvey C y Jackson MH. Assessment of male fertility by semen analysis – an attempt to standardise methods, *Lancet*. 1945; 246(6361): 99-104
3. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2021
4. Lania C, Grasso M, Fortuna De Santis M y Fusi M. Aspiración espermática epididimaria abierta: técnica quirúrgica mínimamente masiva para la obtención de espermatozoides, *Arch Esp Urol*. 2006; 59(3): 313-316
5. Royster MO, Lobdell DT, Mendola P, Perreault SD, Selevan SG, Rothmann SA y Robbins WA. Evaluation of a container for collection and shipment of semen with potential uses in population-based, clinical and occupational settings, *J Androl*. 2000; 21(3): 478-484
6. Owen HD y Katz DE. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of semen stimulant, *J Androl* .2005; 26(4): 459-469
7. Aslan E y Cetinkaya S. Use of miRNA as a biomarker in prostate cancer and new approaches, *Turkish J Oncol*. 2020; 35(1): 99-113.
8. Shabani K, Hosseini S, Nohammad A y Moghbelinejad S. The effects of semen parameters and age on sperm motility of Iranian men, *Global J Fertil Res*. 2017; 2(1): 24-29
9. Azisyan M. Mono-ubiquitination mediated regulation of KMT5A and its role in prostate cancer (Tesis de doctorado). Inglaterra: Universidad Newcastle Upon Tune; 2016
10. Björndahl L, Mortimer D, Barratt, Castilla J, Menkveld R, Kvist U, Álvarez J y Hauden TB. A practical guide to basic laboratory andrology, USA: Cambridge University Press, 2010; pp 5-51
11. Moskovtsev SI y Librach CL. Methods of sperm vitality assessment, En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 927 Ed. Springer Science + Business Media, 2013; pp. 13-19

12. Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE. Particle Distribution in low-volume capillary-loaded chamber *J Androl.* 2005; 26(1): 107-114.
13. Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, y Hankel R. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function, *J Assist Reprod Genet.* 2003; 20(10): 432-438
14. Ferrigno A, Ruvolo G, Capra G, Serra N y Bosco L. Correlation between the DNA fragmentation index (DFI) and sperm morphology of fertile patients, *J Assis Reprod* 2021; 38(4): 979-986
15. Tomlinson MJ, Barratt CL y Cooke ID. Prospective study of Leukocytes and subpopulations in semen suggest they are not a cause of male infertility, *Fertil Steril.* 1993; 60(6): 1069-1075
16. Johannisson E, Campana A, Luthi R y de Agostini A. Evaluation of “round cells” in semen analysis a comparative study, *Hum Reprod Update.* 2000; 6(4): 404-412
17. Couture ML Freund M y Katubig CP. The isolation and identification of exfoliated prostate dells from human semen, *Acta Cytol.* 1980; 24(3): 262-267
18. Aitken RJ. Whinter must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology, *Asian J Androl.* 2010; 12(1): 99-103
19. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo P, Pugliese MN, Sardi SM, Repetto HE, Mazziotta D y Blanco AM. Control de calidad en el estudio de semen, *Acta Biochim Clin Latinoam.* 2008; 42(2): 183-187
20. Brazil Ch, Swan SH, Tollner ChR, Treece C, Drobniz EZ, Wang C, Redmon JB y Overstreet J. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study, *J Androl.* 2004; 25(4): 645-656
21. Cooper TG, Atkinson AD y Nieschlag E. Experience with external quality control in spermatology, *Hum Reprod.* 1999; 14(3): 765-769
22. Dharan M. Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos. España: Reverté; 2002, Pp. 40-56
23. Díaz-Padilla D y Santoyo-Pérez M. El laboratorio clínico en la mejoría continúa de la calidad, *Rev Ciencias Médicas.* 2019; 3(23): 357-359.
24. Clavero A, Gonsalvo MC, Serrano M, Orozco I, Mantilla A, Rosales A, Molina I y Castilla AJ. Control de calidad en el análisis de semen. En: Cerezo PG, editor. Manual para el Análisis Básico de Semen: Una guía práctica. México: Prado, 2013; Pp. 95-114.
25. S. Ventura Pedret, P. Chueca Rodríguez, I. Rojo Vizcaíno, J.L. Castaño Vidriales. Errores relacionados con el laboratorio clínico. *Química Clínica* 2007;26(1): 23-28.
26. Sistema de Gestión de la Calidad en el Laboratorio. OMS, 2016. pp. 181-196.
27. Westgard JO. Prácticas básicas de control de calidad. Capacitación en control estadístico de calidad para laboratorios clínicos. Ed. Wallace Coulter, 2013. pp. 260-261.
28. Westgard JO. Sistemas de Gestión de la Calidad para el Laboratorio Clínico. Ed. Wallace Coulter, 2014. pp. 222-230.
29. Organización Internacional de Normalización (ISO). Basic semen examination – Specification and test methods. (ISO23162:2021); <https://www.iso.org/standard/74800.html>





# ACTUALIZACIÓN 2021 SOBRE EL EXAMEN BÁSICO DEL SEMEN POR LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS) Y LA NORMA ISO

Lars Björndahl

ANOVA – Hospital Universitario Karolinska, Estocolmo, Suecia.

Autor Corresponsal: Dr. Lars Björndahl. Norra Stationsgatan 69, plan 4S-113 64 STOCKHOLM SWEDEN. Telefono: +46-8-5177 1936. Correo electrónico: [lars.bjorndahl@ki.se](mailto:lars.bjorndahl@ki.se)

## Cápsula

En 2021 se revisó el manual de la OMS sobre el análisis del semen y se publicó una norma internacional sobre el examen básico de semen, para mejorar la calidad de las investigaciones sobre la salud reproductiva masculina.

## Resumen

El manual de la OMS sobre el análisis del semen, se ha convertido en una recomendación mundial para realizar un trabajo adecuado de laboratorio para el análisis del semen. La reciente revisión del manual de la OMS no ha cambiado los principios generales, pero se han realizado esfuerzos para facilitar el cumplimiento mejorando las instrucciones. La norma ISO 23162: 2021 es una adición para facilitar los procedimientos de acreditación de los laboratorios individuales.

## Introducción

Una base para la evaluación de la salud reproductiva masculina es el examen del eyaculado. Esto es esencial no solo cuando la principal preocupación es la infertilidad, sino también en la investigación de posibles trastornos reproductivos masculinos, como el hipogonadismo. Una adecuada producción de espermatozoides puede servir como un indicador de la función testicular, así como un indicador de la restauración de las funciones endocrinas. Este capítulo se centra en algunas mejoras importantes, de la edición más reciente del manual de la OMS (1) y la publicación de la primera norma internacional sobre el examen básico del semen (ISO23162: 2021) (2).

El manual de la OMS para el examen del semen es una publicación mundialmente conocida. Su origen (3) fue una parte importante de los esfuerzos realizados, para desarrollar un anticonceptivo masculino funcional. Los métodos de laboratorio óptimos para detectar la disminución y la eliminación de la producción espermática, así como para encontrar evidencias de restauración, eran una necesidad. A partir de recomendaciones muy breves, el manual se convirtió en descripciones más elaboradas de procedimientos operativos, y técnicas adicionales relacionadas con la investigación y la reproducción asistida (RA), en las ediciones posteriores (4-7). Se ha invertido mucho trabajo para describir la fisiología y fisiopatología subyacentes, y poder explicar los desafíos muy específicos que se asocian con el examen del eyaculado: ¡un “fluido corporal” que no existe en el cuerpo! En realidad, el eyaculado se forma durante la eyaculación, y ni siquiera en la hembra existe una “muestra de semen” bien mezclada similar a la que se analiza en el laboratorio (8). Incluso se ha demostrado que la influencia de las últimas fracciones del eyaculado ejerce un efecto negativo sobre la motilidad del espermatozoide, la supervivencia y protección del contenido de la cromatina (9-11).

El manual de la OMS nunca ha sido una guía clínica. Es un manual de laboratorio que ofrece recomendaciones sobre los procedimientos, que se espera, proporcionen resultados

precisos, siempre y cuando, el personal del laboratorio esté debidamente entrenado. Los criterios de la OMS se formulan en un contexto totalmente diferente, y proporcionan asesoramiento clínico basado en la evidencia para el mejor tratamiento disponible, en diferentes situaciones médicas.

En el mundo de los laboratorios, la acreditación mediante una norma ISO es una forma de obtener evidencia, de que el laboratorio tiene rutinas y procedimientos aceptables, para entregar resultados confiables. Una norma general para laboratorios médicos es la ISO15189 (12). Aunque cubre los principios generales de organización, competencia y documentación, no cubre los aspectos específicos del examen del semen. Esto último resultó ser un problema en muchos países: la acreditación específica de acuerdo con el manual de la OMS no era posible, debido a que las recomendaciones del manual no estaban formuladas como una norma formal. Como consecuencia de este problema global, se inició un Grupo de Proyecto por parte del Comité Técnico ISO 212 (Pruebas de laboratorio clínico y sistemas de pruebas de diagnóstico in vitro), Grupo de Trabajo 1 (Calidad y competencia en el laboratorio médico) con el alcance de estandarización y orientación en el campo de la medicina de laboratorio.

### **OMS 2021, la edición revisada (1)**

El Comité Editorial estuvo formado por expertos en el campo del semen y la ciencia del espermatozoide, por invitación de la OMS, y expertos dentro de la OMS. Se formaron grupos de trabajo más pequeños para escudriñar el texto de la 5ª edición.

En principio, las técnicas descritas en la 5ª edición (7) se basaron en procedimientos sustentables. Sin embargo, la experiencia de los cursos estandarizados con entrenamiento teórico y práctico (13-16) mostraron que los procedimientos debían ser revisados, para ser mejor entendidos y cumplir con las recomendaciones de la OMS. Por lo tanto, la revisión se centró en describir los pasos prácticos en un orden más lógico, y las explicaciones y comentarios adicionales, se trasladaron a una subsección especial.

El capítulo sobre control de calidad también se ha revisado con menos atención, para la mayoría de los lectores, (por fórmulas matemáticas complicadas), y se ha dado más atención a ejemplos prácticos con cálculos explicados paso a paso.

### **Motilidad espermática**

En ediciones anteriores (5, 6) la evaluación de la motilidad distinguía entre espermatozoides progresivos rápidos y lentos. Esto fue importante porque se ha demostrado que la ausencia de espermatozoides rápidos, es un factor negativo muy fuerte para el éxito reproductivo, tanto in vivo como in vitro (8, 17-28). El motivo principal de la decisión de abandonar la recomendación de distinguir entre espermatozoides de progresión rápida y lenta, fue la supuesta dificultad de ese procedimiento en la evaluación manual (29). Sin embargo, existe evidencia de que con la capacitación adecuada, el personal de laboratorio puede proporcionar resultados con alta precisión (30, 31). También es fundamental tener en cuenta, que no se trata de determinar la velocidad exacta de los espermatozoides individuales (como lo pueden hacer los equipos CASA), si no se trata de reconocer aquellos que se mueven con una velocidad de 25  $\mu\text{m} / \text{s}$  o más (o mover aproximadamente media cola de esperma por segundo).

### **Morfología de los espermatozoides**

Los principales procedimientos para la evaluación de la morfología de los espermatozoides humanos, siguen siendo de ediciones anteriores. Sin embargo, se ha expresado con más claridad, que la tinción recomendada es la tinción de Papanicolaou adaptada para espermatozoides. La razón es que es con esta técnica de tinción, se han evaluado los Criterios Estrictos de Tygerberg, en relación al éxito reproductivo in vivo e in vitro (32-36). Los criterios estrictos se desarrollaron a partir de estudios sobre espermatozoides humanos, que habían penetrado el moco cervical, y además, sobre espermatozoides capaces de unirse a la zona pelúcida humana (34).

Otra ampliación importante de las perspectivas del examen de semen, es que la morfología no solo debe considerarse como una herramienta de pronóstico para el éxito reproductivo in vivo o in vitro. La morfología de los espermatozoides puede proporcionar información crucial sobre la función testicular (espermatogénesis), así como explicar, por ejemplo, las causas de la motilidad deficiente de los espermatozoides (por ejemplo, trastornos ciliares) o explicar el fracaso de la

fertilización (por ejemplo, defectos de los acrosomas). Además, dado que las anomalías de la cabeza son un defecto dominante, puede resultar tentador solo informar la morfología de los espermatozoides, basándose únicamente en la morfología de la cabeza. Para contrarrestar que se ignoren otros defectos, la recomendación en la nueva edición es aplicar un orden estructurado y secuencial de evaluación morfológica basado en una técnica publicada por Rothmann y cols. (37). Para la formación, así como para el control de calidad interno, y el aseguramiento de la calidad externa, también es necesario que todo el personal esté capacitado y evaluado, para el análisis de la morfología de los espermatozoides. Esto es necesario incluso para los laboratorios que no informan el TZI (Índice de Teratozoospermia (32)), ya que la proporción de espermatozoides "normales" o "ideales" no solo depende de los defectos de la cabeza.

### **Evaluaciones repetidas**

Para la concentración de espermatozoides solo se requiere una dilución, siempre que dicha dilución se realice estrictamente de acuerdo con las recomendaciones (38). Aun así, es esencial realizar la evaluación en la cámara de recuento en dos repeticiones y comparar los resultados para reducir el riesgo de alícuotas no representativas, de la suspensión de espermatozoides diluida. También para la evaluación de la motilidad, se requiere comparar la evaluación repetida para obtener resultados precisos.

Con respecto a la evaluación de la morfología y la vitalidad de los espermatozoides en frotis teñidos, es más importante evaluar en total al menos 200 espermatozoides en un portaobjetos, que hacer comparaciones de evaluaciones repetidas (39). Por lo tanto, para evitar una carga de trabajo innecesaria, ya no existe la recomendación de realizar evaluaciones duplicadas de la morfología y vitalidad de los espermatozoides.

### **Límites de referencia**

Un problema común es un malentendido general de los datos, de la distribución de datos, de una población de referencia (40). Hasta la 5ª edición, los límites de consenso se publicaron como orientación, aunque se alentó a cada laboratorio a desarrollar sus propios límites. En la 5ª edición, se publicó un gran conjunto de datos de hombres en parejas que comenzaron un embarazo dentro de los 12 meses posteriores al intento (41). Estos datos se procesaron y completaron con otros datos para la 6ª edición (42).

Un problema fundamental es que a menudo se cree que el percentil 5 de los datos de la población de referencia, es un límite verdadero y simple, entre hombres fértiles y hombres infértiles. Pero eso no es verdad.

Primero, la población de referencia es mixta: los hombres en parejas que comienzan un embarazo dentro de los 12 meses (tiempo hasta el embarazo, TTP,  $\leq 12$  meses) segundo, no es un grupo bien definido. La mayoría de las parejas que dejan de usar anticonceptivos conciben dentro de los cuatro meses (43). Una publicación reciente (44) muestra que los hombres en parejas que comienzan un embarazo en unos pocos meses, tienen resultados de análisis de semen mucho más altos, que el percentil 5 inferior reportado en los manuales de la OMS (1,7). Estas distribuciones siguen siendo valiosas para comprender mejor los resultados de un paciente, pero los "límites" no deben considerarse como el punto de corte para la fertilidad; lo que es aún más importante, el límite no se usa para categorizar a los hombres como fértiles o infértiles, en estudios que tienen como objetivo definir otros marcadores de infertilidad.

### **ISO 23162: 2021 (2)**

El trabajo en los Comités Técnicos (CT) y Grupos de Trabajo (GT) de ISO se basa en la participación internacional comenzando con los Grupos de Proyectos (GP) donde los expertos son nominados por los países participantes en los CT. Luego, las sugerencias de los expertos se distribuyen en varios pasos a los países miembros, primero en el GT, luego en el CT y finalmente entre todos los países participantes en la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) con un voto formal de aprobación o desaprobación. Después de cada votación, los GP reciben comentarios y revisan el proyecto de norma, para finalmente sugerir un documento para la norma formal, que es votado por todos los países miembros. Si se aprueba, la norma es publicada por la ISO.

La nueva norma (ISO23162: 2021, (2)) se basa en los mismos principios que el manual de la OMS (1). El objetivo principal fue proporcionar una herramienta para que los laboratorios individuales, fueran acreditados de acuerdo con los principios de los procedimientos, recomendados por el manual de la OMS. La existencia de una norma ISO, significa que cada uno de los laboratorios no necesitará demostrar que los métodos utilizados son precisos, esto sería muy complicado y causaría mucho trabajo adicional, si no existiera esta nueva norma ISO.

## **Conclusiones**

El manual de la OMS y la norma ISO concomitantemente, se han desarrollado para facilitar el trabajo de los laboratorios que realizan análisis de semen, y poder lograr resultados precisos. En el manual de la OMS se han revisado los procedimientos básicos para aumentar el cumplimiento y la utilidad clínica. Con la norma ISO se espera facilitar los procedimientos de acreditación.

## **Agradecimientos**

Este texto no es una publicación formal respaldada por la OMS; son completamente los puntos de vista y opiniones del autor.

## **Posibles conflictos de intereses y prejuicios**

El autor ha sido editor en jefe de la revisión del actual manual de la OMS 2021 sobre examen del semen, y líder del proyecto para el desarrollo de la norma ISO23162: 2021.

## **Referencias**

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization, 2021.
2. International Standards Organization. ISO 23162:2021 Basic semen examination – Specification and test methods. Geneva: ISO, 2021.
3. Belsey M, Eliasson R, Gallegos AJ, Moghissi KS, Paulsen CA, Prasad AMN. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Singapore: Press Concern, 1980.
4. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1987.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
7. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
8. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertility and sterility* 1951;2:187-204.
9. Lindholmer C. Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertility and sterility* 1973;24:521-6.
10. Lindholmer C. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biology of reproduction* 1974;10:533-42.

11. Björndahl L, Kvist U. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive biomedicine online* 2003;7:440-8.
12. International Standards Organization. ISO 15189:2012 Medical Laboratories – Requirements for Quality and Competence. Geneva, 2012.
13. Punjabi U, Spiessens C. Basic Semen Analysis Courses: Experience in Belgium. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E, eds. *Modern ART in the 2000s - Andrology in the nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998:107-13.
14. Vreeburg JTM, Weber RFA. Basic Semen Analysis Courses: Experience in the Netherlands. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E, eds. *Modern ART in the 2000s - Andrology in the nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998:103-6.
15. Björndahl L, Kvist U. Basic Semen Analysis Courses: Experience in Nordic Countries. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E, eds. *Modern ART in the 2000s - Andrology in the nineties*. London, UK: The Parthenon Publishing Group, 1998:114-22.
16. Björndahl L, Barratt CL, Fraser LR, Kvist U, Mortimer D. ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002;17:1299-305.
17. Barratt CL, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Human reproduction (Oxford, England)* 2011;26:3207-12.
18. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, Richardson DW. 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* 1985;73:441-9.
19. Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *Journal of reproduction and fertility* 1986;78:93-102.
20. Comhaire FH, Vermeulen L, Hinting A, Schoonjans F. Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:326-31.
21. Barratt CL, McLeod ID, Dunphy BC, Cooke ID. Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Human reproduction (Oxford, England)* 1992;7:1240-4.
22. Irvine DS, Aitken RJ. Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service. *Human reproduction (Oxford, England)* 1986;1:539-45.
23. Bollendorf A, Check JH, Lurie D. Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization. *Journal of andrology* 1996;17:550-7.
24. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R *et al*. World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005;20:2769-75.

25. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y. A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)* 1998;13:3103-7.
26. Björndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl* 2010;12:33-5.
27. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl* 2010;12:26-32.
28. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Human reproduction (Oxford, England)* 1999;14:2313-9.
29. Cooper TG, Yeung CH. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertility and sterility* 2006;85:220-4.
30. Mortimer D. Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review* 1994;3:97-111.
31. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
32. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *Journal of andrology* 2001;22:192-205.
33. Menkveld R, Kruger TF. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *International journal of andrology* 1995;18 Suppl 2:36-42.
34. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular reproduction and development* 1991;30:346-52.
35. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human reproduction (Oxford, England)* 1990;5:586-92.
36. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM *et al*. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human reproduction (Oxford, England)* 2001;16:1165-71.
37. Levine H, Mohri H, Ekblom A, Ramos L, Parker G, Roldan E *et al*. Male reproductive health statement (XIIIth international symposium on Spermatology, may 9th-12th 2018, Stockholm, Sweden. *Basic and clinical andrology* 2018;28:13.
38. Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human reproduction (Oxford, England)* 1986;1:299-303.
39. Mortimer D. A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin-nigrosin staining. *Reproductive biomedicine online* 2020;40:851-5.
40. Björndahl L. What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Human fertility (Cambridge, England)* 2011;14:179-86.

41. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update* 2010;16:231-45.
42. Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, Schlatt S, Festin MPR, Björndahl L *et al.* Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology* 2021.
43. Tietze C. Fertility after discontinuation of intrauterine and oral contraception. *Int J Fertil* 1968;13:385-9.
44. Keihani S, Verrilli LE, Zhang C, Presson AP, Hanson HA, Pastuszak AW *et al.* Semen parameter thresholds and time-to-conception in subfertile couples: how high is high enough? *Human reproduction (Oxford, England)* 2021;36:2121-33.

*Traducido, revisado y editado por el Biol. Gerardo Cerezo Parra.*



# EL VALOR DE LA MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Thinus Frans Kruger

Clínica Aevitas, Hospital Vincent Pallotti, Pinelands, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

Autor Corresponsal: Dr. Thinus Kruger. Vincent Pallotti Hospital Park Road, Pinelands, 7450, Teléfono: +27 21 531 6999.  
Correo electrónico: [krugertf@gmail.com](mailto:krugertf@gmail.com)

## **Fertilización *in vitro* (FIV): antecedentes históricos**

Con la primera publicación en 1986 sobre el impacto de la morfología de los espermatozoides en la tasa de fecundación y embarazo en reproducción asistida (Kruger et al., 1986), no se comprendió cómo esta observación impactaría en la investigación en este campo y en la arena clínica en las técnicas de reproducción asistida (TRA) en los siguientes 30 años. Inicialmente se pensó que se había hecho una observación que era exclusiva de Sudáfrica, pero con mi visita postdoctoral en 1986 a la Escuela de Medicina de Eastern Virginia, Norfolk Virginia, EE. UU., me di cuenta de que los mismos defectos de morfología de los espermatozoides eran visibles en los pacientes varones en los EE. UU. En el Instituto Jones, los pacientes a menudo se presentaban sin fertilización, pero los científicos no reconocieron en ese momento que había un problema en la morfología de los espermatozoides, en muchos de estos hombres. Estos defectos en los espermatozoides podrían explicar la falta de fertilización en muchos de los casos. Se les informó de esta anomalía y esta conciencia condujo a un segundo estudio observacional prospectivo sobre el impacto de la morfología de los espermatozoides, en la tasa de fertilización y la tasa de embarazo en su programa de TRA. Los datos se correlacionaron con los de la publicación de Tygerberg de 1986 en *Fertility and Sterility* (Kruger et al. 1986) y una segunda publicación siguió en 1987 con datos obtenidos en el Instituto Jones en Norfolk (Kruger et al., 1987). La información sobre la morfología de los espermatozoides y su impacto en la tasa de fertilización y la tasa de embarazo en la FIV también fue compartida por primera vez con la comunidad internacional por el Dr. Anibal Acosta en la Conferencia Mundial sobre FIV en 1987. Esta conferencia y las publicaciones en 1986, 1987 y 1988 despertaron un interés renovado en el campo de la infertilidad masculina en todo el mundo, y especialmente en la morfología de los espermatozoides. Siguió numerosas publicaciones sobre este tema y la mayoría confirmó las observaciones iniciales sobre fertilización y embarazo en fertilización *in vitro*.

En la primera publicación de 1986 se afirmó que se han descrito diferentes medios para evaluar las características morfológicas normales. Sin embargo, para responder a la pregunta de si existe un valor pronóstico en cuanto a fecundación y tasa de gestación en fecundación *in vitro*, utilizando este parámetro (utilizando criterios estrictos). (Kruger y col. 1986). La definición detallada de lo que es una forma normal fue publicada por Menkveld (Menkveld et al., 1990) y fueron estos principios, esbozados por Menkveld, los que se utilizaron en la publicación de 1986.

Para reiterar la conclusión del estudio de 1986, se afirmó claramente que la morfología de los espermatozoides es un factor importante para predecir el resultado de la fertilización y el embarazo. En un modelo de regresión logística también se destacó que el número de ovocitos también juega un papel importante en el resultado y que el factor masculino no debe considerarse de forma aislada. Ya en la primera publicación se explicó la importancia de los criterios estrictos y en qué se diferenciaban de los criterios de la OMS de entonces (OMS 1980). En ese momento se citó a Menkveld (datos no publicados) diciendo que nuestro laboratorio tiene un alto grado de

exactitud y precisión en la evaluación de la morfología estricta de los espermatozoides. Esto se publicó más tarde en detalle (Menkveld et al., 1990).

La publicación en 1986 fue el comienzo de un viaje científico que abrió nuevas e interesantes avenidas en el campo de la infertilidad masculina a nivel nacional e internacional.

Se publicaron varios artículos como resultado de los estudios postdoctorales en el Instituto Jones en Norfolk Virginia. El primero (Kruger et al. 1987) fue un estudio prospectivo para evaluar el impacto de la morfología de los espermatozoides en la tasa de fertilización y el resultado del embarazo en el programa in vitro del Instituto Jones, Norfolk, Virginia, EE. UU. Los hallazgos mostraron las mismas tendencias que en la primera publicación de 1986 en Ciudad del Cabo.

### **Patrones de morfología de los espermatozoides**

El siguiente paso en la búsqueda por comprender mejor el grupo de baja morfología (<14%) fue estudiar este grupo con menor potencial de fertilización. En este artículo se estableció claramente, por primera vez, que 3 patrones morfológicos se utilizarían clínicamente [patrón P, patrón G y patrón N] (Kruger et al., 1988). El patrón P, de 0 a 4% de formas normales, es el grupo de patrón pobre. En este artículo se informó una tasa de fertilización del 7,6% para el grupo de patrón P en comparación con el 63,9% para el grupo de patrón G (5 a 14% de formas normales). El grupo de patrón G se definió como aquellos con buen pronóstico. El término patrón N se utilizó para aquellos con formas normales por encima del 14% de lo normal y en publicaciones anteriores tenían una tasa de fertilización de más del 80%. Esta publicación y la publicación de 1986 se convirtieron en una de las publicaciones más citadas en la historia de la fertilidad y la esterilidad según se informó en 2006 (Yang y Pan 2006). El uso de estos patrones en la práctica clínica siguió en todo el mundo, con varias publicaciones para probar la validez de los umbrales de morfología espermática sugeridos.

### **Acceder a la aceptación de la literatura internacional de las observaciones iniciales y los informes científicos. Una revisión de la literatura estructurada después de 10 años**

Pasaron más de 10 años después de la primera publicación sobre morfología de los espermatozoides en 1986, con numerosas publicaciones y debates en conferencias internacionales, para "resolver" el problema predictivo de la morfología de los espermatozoides para la fertilización in vitro. Un estudiante de doctorado en el Departamento de Medicina Reproductiva del hospital Tygerberg, el Dr. Kevin Coetsee utilizó una revisión estructurada de la literatura para estudiar la pregunta, ¿existe un valor predictivo universal de la morfología normal en la FIV? Estos hallazgos se publicaron en 1998 (Coetsee et al., 1998). En este estudio (metanálisis) la tasa de fertilización fue del 59,3% (1979/3337; por ovocito) en el grupo de patrón P en comparación con el 77,6% (10345/13327; por ovocito) en los grupos de patrón G / N. Las tasas generales de embarazo fueron del 15,2% por ciclo (60/395) (patrón P) y del 26% (355/1368) por ciclo en los grupos de patrón G / N. De importancia fue el hecho de que el 24% de los pacientes no tuvieron transferencia en el grupo de patrón P en comparación con el 7,4% en los grupos de patrón G y N. Se concluyó que la morfología normal de los espermatozoides evaluada con precisión, como parte integral del análisis de semen estandarizado, hace que este sea el medio más rentable de evaluar al hombre con capacidad predictiva, para ayudar al médico y al científico en la toma de decisiones. En una publicación de 1999, en *Human Reproduction Update*, se resumió y explicó con más detalle el papel de la morfología de los espermatozoides en la fertilización in vitro (Kruger et al., 1999). También hubo una reflexión en este artículo sobre la correlación de las pruebas funcionales de los espermatozoides, así como la evaluación de los espermatozoides asistida por computadora con la morfología manual de los espermatozoides.

La capacidad predictiva de la morfología de los espermatozoides y otros parámetros del semen es un debate en curso. (Ejemplos de artículos que apoyan la morfología de los espermatozoides como predictor de la fertilización in vitro y las tasas de embarazo (Donnelley ET et al.) Mientras que otros no encontraron ningún beneficio en absoluto (Van den Hoven et al.)

### **Explorar la influencia de la morfología de los espermatozoides en la tasa de embarazo por inseminación intrauterina (IIU)**

La IIU es más simple, más barata y más disponible para el público en general como tratamiento para la infertilidad, ya sea que se use para la infertilidad idiopática o la infertilidad por factor masculino. La pregunta fue hecha por van Waart (Van Waart et al., 2001): ¿es la morfología de los espermatozoides un indicador del resultado del embarazo en el grupo de patrón P versus los patrones G y N en un programa de IIU?

Después de realizar una cuidadosa revisión estructurada de la literatura, se demostró en un meta-análisis que hay una mejora significativa en la tasa de embarazo por encima del umbral del 4% para criterios estrictos. Esta fue una publicación importante que mostró por primera vez que las observaciones realizadas in vitro eran repetibles en la situación in vivo, en este caso los programas de IIU. La tasa de embarazo en el patrón P frente al patrón G mostró una diferencia del 7% por ciclo en el tratamiento.

Se continuaron los estudios sobre el factor masculino y su impacto en el resultado del embarazo en un programa de IIU. En un estudio realizado por un médico visitante de Malta, se sugirió estudiar los factores masculinos y femeninos y el posible efecto sobre el resultado del embarazo en el programa de IIU en el Hospital Tygerberg (Montanaro et al., 2001). En este gran estudio de 522 ciclos de tratamiento se concluyó que el número de folículos era de importancia en el resultado del embarazo, especialmente en el caso de un factor masculino. En cuanto a la morfología de los espermatozoides, informamos una tasa de embarazo del 2,6% en el grupo de patrón P, 11,4% en el grupo de patrón G y 24% en el grupo de patrón N. Otros factores femeninos que influyeron negativamente en el resultado fueron la endometriosis y la infertilidad por factor tubario. Por tanto, es importante darse cuenta de que los factores masculinos y femeninos contribuyen al resultado del embarazo, pero el médico puede influir en el pronóstico aumentando el número de folículos, especialmente en casos de infertilidad severa por factor masculino.

Todavía hay un debate en curso sobre los hallazgos anteriores donde algunos encuentran una tasa de embarazo significativamente más baja en el grupo de patrón P vs el grupo del patrón G (Lemmens L et al., Patounakis G et al.) y otros no ven diferencias, ningún impacto de la morfología del esperma en las tasas de embarazo con IIU (Erdem M et al., Deveneau NE et al.). Sin embargo, la mayoría recomienda la IIU como primera opción de tratamiento antes de las modalidades de tratamiento de FIV / ICSI que son de mayor costo. Una explicación de la variación en los resultados, como se explicó anteriormente, puede deberse a una desviación en la precisión en la evaluación de la morfología del esperma mediante criterios estrictos. Morbeck y col. ilustró esta observación en un elegante artículo que estudia 2 épocas. Franken y col. demostró que la formación en morfología de los espermatozoides y el control de calidad de seguimiento por parte de un laboratorio de referencia mantendrá una lectura precisa y unos resultados confiables. La falta de capacitación en el campo es uno de los problemas que conduce a resultados clínicos inexactos o resultados clínicos diferentes, por ejemplo, en los programas de IIU, como se ilustra arriba.

### **Para evaluar el valor de la selección de espermatozoides para la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): ¿Debería realizarse ICSI en todos los pacientes de FIV?**

Roldan escribió que el uso generalizado de ICSI se basa, en parte, en la creencia de que no es necesario prestar atención a los aspectos de la función de los espermatozoides porque la selección de los espermatozoides se vuelve irrelevante si se inyecta un espermatozoide en el ovocito (Roldan et al. 2006). Por otro lado, la comprensión de los mecanismos subyacentes de la función de los espermatozoides durante la fertilización, es importante para obtener resultados exitosos con ICSI. Esta comprensión puede conducir a una mejora adicional de los resultados de la fertilización que conducen a una mejor calidad del embrión y, por lo tanto, a mejores tasas de embarazo. Roldan también sugirió que los espermatozoides que reaccionan con el acrosoma pueden dar mejores tasas de embarazo cuando se usan para el procedimiento de ICSI. Tengo conocimiento de los umbrales de semen que ayudarán a seleccionar a los pacientes que realmente necesitan el procedimiento de ICSI. Existe una tendencia a ofrecer ICSI a todos los pacientes. Este enfoque va en perjuicio del paciente y, a veces, del médico / científico. Es importante que el médico mantenga su habilidad para hacer un buen diagnóstico clínico y poder ofrecer soluciones simples para los problemas de infertilidad en muchos casos. Sin una comprensión del análisis de semen tanto para el científico como para el clínico, esta habilidad se perderá con claras consecuencias para el paciente y la ciencia reproductiva en su conjunto. Este

fue el trasfondo del artículo escrito, que aborda la cuestión de si se debe ofrecer ICSI a todos los pacientes (Kruger et al. 2009).

Existen numerosos estudios sobre diferentes métodos de selección y una revisión reciente resumió los diferentes métodos elegantemente ((Rajasingam S) Para el propósito de este capítulo, solo se discutirá la unión del ácido hialurónico que también se ocupa de la morfología de los espermatozoides y la IMSI.

### **Estudiar el impacto de la selección de espermatozoides en la práctica clínica en ART Selección de espermatozoides mediante la unión de ácido hialurónico**

Se informó que los hombres con baja morfología de los espermatozoides (patrón P) tenían más anomalías en el ADN y aneuploidía de los espermatozoides que los grupos con patrón G y patrón N (Lee et al., 1996). Estos grupos de patrón P también tenían peor unión de espermatozoides a la zona pellucida y capacidad de reacción del acrosoma en comparación con los hombres con parámetros de semen normales (Oehninger et al., 2000, Bastiaan et al., 2003). Fue este conocimiento y la experiencia práctica de la baja tasa de fertilización en el grupo de patrón P lo que despertó el interés en la selección de espermatozoides para ICSI. Se discutió a menudo la publicación de Menkveld (Menkveld et al., 1999) sobre la selección de las formas normales por la zona pelucida. Surgió la pregunta, ¿por qué todas estas formas normales perfectas estaban unidas a la zona pelúcida?

La observación de Huzar (Huzar et al., 2007) de que las formas normales unidas a la zona eran ricas en ácido hialurónico (AH) y que había menos aneuploidía reportada en las formas observadas fue de gran interés para la comunidad científica. Estos autores (Huzar et al., 2007) también han demostrado que los espermatozoides maduros se unen selectivamente a AH en estado sólido. Estos espermatozoides carecen de retención citoplasmática, histonas persistentes y fragmentación del ADN con menor frecuencia de aneuploidía cromosómica. Los espermatozoides de forma ovalada normal también fueron significativamente más ricos en ácido hialorónico en comparación con las formas amorfas. Un estudio colaborativo seguido iniciado por Huzar. En un estudio ciego, después de que se realizó la selección con ácido hialorónico de los espermatozoides en comparación con un grupo de control no seleccionado, se leyó el porcentaje de formas normales. Esto llevó a la publicación de Prinosilova (Prinosilova et al., 2009). Se observó que tuvo lugar una mejora significativa en la selección de las formas ideales en el grupo de ácido hialurónico (prueba) en comparación con el control.

En un metanálisis que comparó la selección de espermatozoides con ácido hialorónico frente al control de Beck-Fruchter et al., Informaron que la calidad del embrión y la tasa de implantación fueron superiores en el grupo hilarónico, al incluir todos los artículos disponibles. Cuando solo se incluyeron estudios prospectivos, la ventaja en la tasa de implantación desaparece. Para los dos resultados principales (tasa de fertilización y tasa de embarazo clínico) o para la tasa de nacidos vivos, no observaron ningún beneficio. Se concluyó que no existe una indicación clara para el uso rutinario de la selección de espermatozoides con ácido hialurónico. Sin embargo, animaron a que se realicen más investigaciones en este campo. (Beck-Fruchter et al.). Además, 2772 parejas fueron asignadas al azar para recibir PICSÍ (n = 1387) o ICSI (n = 1385), se incluyeron en el análisis primario. El término tasa de nacidos vivos no difirió significativamente entre los grupos PICSÍ (27,4%) e ICSI (25,2%). (Miller et al. 2019)

En 2014, Mokanszki et al informaron de una tasa de embarazo significativamente mejorada en un grupo de control vs PICSÍ (selección de ácido hialurónico). Este estudio no se incluyó en el metanálisis discutido anteriormente.

Sin embargo, en mi opinión, el veredicto aún está abierto para la selección de espermatozoides en casos graves de factor masculino. Basado en el hecho de que los espermatozoides de forma normal sin vacuolas, tienen menos defectos (estos espermatozoides carecen de retención citoplasmática, histonas persistentes y fragmentación del ADN con menor frecuencia de aneuploidía cromosómica), en comparación con los espermatozoides anormales. Por lo tanto, al menos en el factor masculino severo, la selección de espermatozoides con ácido hialurónico y una evaluación cuidadosa de los espermatozoides que se inyectarán es obligatoria para el laboratorio especializado de ICSI. Se necesita más investigación para los casos graves de factor masculino con respecto a la selección de espermatozoides.

## **Razones para una cuidadosa evaluación morfológica antes de ICSI**

De Vos (De Vos et al. 2003) informó que con una selección cuidadosa de la forma ideal, utilizando el microscopio invertido, las tasas de preñez se pueden mejorar significativamente. Esta observación clínica puede posiblemente explicarse por el hecho de que los espermatozoides anormales, tienen aberraciones cromosómicas estructurales cuatro veces más altas, y otros problemas según lo informado por Huzar y (por ejemplo, fragmentación anormal del ADN de los espermatozoides) como se mencionó en la sección anterior. (Lee et al. 1996) (Huzar et al. 2007) (Garolla et al.)

## **Selección de espermatozoides utilizando IMSI (Inyección de espermatozoides seleccionados de morfología intracitoplasmática )**

El trabajo de Bartoov (Bartoov et al. 2001) que trajo el concepto de selección de esperma a un primer plano. La selección de espermatozoides con gran aumento, seleccionando la forma ideal si es posible, resolvió las bajas tasas de embarazo en parejas con fracasos repetidos. Este método se llamó IMSI. Berkovitz (Berkovitz et al. 2001) observó una peor calidad del embrión y tasas de embarazo más bajas, con tasas de aborto más altas, si no se encontraban espermatozoides normales para la inyección de espermatozoides.

En un ensayo controlado aleatorizado, Antinori informó una mejora significativa en la tasa de embarazo en el grupo IMSI frente al grupo ICSI. (Antinori et al., 2008). El Khattabi et al. también observó una tasa de natalidad significativa más alta en el grupo IMSI frente al grupo ICSI para pacientes con teratozoospermia. (tasa de natalidad de vida 38% en el grupo IMSI vs 20% en el grupo ICSI). (El Khattabi et al. 2013). En los últimos años, varios científicos estudiaron un solo espermatozoide y sus características fisiológicas, y estas observaciones pueden ser la explicación de un mayor éxito en pacientes con factor masculino grave. Garolla (Garolla et al. 2008) informó que los espermatozoides ideales tienen menos aneuploidía, menos daño mitocondrial y menos fragmentación del ADN que los espermatozoides con 1 o más vacuolas. Las observaciones de Vanderzwalmen y Franco se correlacionan con las de Garolla. (Garolla et al. 2008; Vanderzwalmen et al., 2008; Franco et al., 2008).

Sin embargo, los estudios que evalúan el uso de IMSI en el campo de la medicina reproductiva clínica han extraído conclusiones contrastantes. Un metaanálisis de Teixeira et al. revisó nueve ensayos controlados aleatorios que evaluaron 2.014 parejas, y concluyó que la evidencia actual no respalda adecuadamente el uso rutinario de IMSI. Debido a que también es un procedimiento costoso, se necesitan más estudios con tamaños de muestra más grandes para confirmar su valor antes de recomendarlo.

En 1986 se informó que el porcentaje de formas normales tiene un impacto en las tasas de fecundación y preñez (Kruger et al. 1986). Inicialmente se observó que la unión de la zona, la reacción del acrosoma, la entrada de calcio y el ensayo de penetración de los espermatozoides se vieron afectados en los grupos del patrón P (defectos fisiológicos) (Oehninger et al. 2000, Oehninger et al. 1994, Franken et al. 1990, Bastiaan y col., 2003). Estos defectos fisiológicos se informaron en pacientes con anomalías graves en la forma de los espermatozoides (patrón P). Ahora tenemos nueva evidencia de que un solo espermatozoide morfológico normal es fisiológicamente más competente. (Garolla et al. 2008). (Menos fragmentación de ADN, aneuploidía o descondensación de cromatina) Los espermatozoides morfológicamente anormales o aquellos con al menos una vacuola observada tienen altos niveles de aneuploidía de espermatozoides, fragmentación anormal de ADN o descondensación de cromatina.

El "efecto paterno tardío" comienza después de la activación genómica del embrión, en la etapa de 4-8 células. Un efecto tardío deteriorado podría cambiar la capacidad del embrión en etapa de escisión temprana, para convertirse en blastocitos viables. En consecuencia, se puede sugerir que la mejora en LBR después de IMSI en comparación con ICSI en presencia de teratozoospermia severa, se explica por una selección óptima de espermatozoides con una cantidad mínima de vacuolas, que tienen las mejores posibilidades de producir un blastocisto viable. Se necesitan más estudios para comprender los mecanismos subyacentes de la formación de vacuolas y sus consecuencias en el desarrollo del embrión.

A pesar de los mismos resultados clínicos en el metaanálisis ICSI vs. IMSI de pacientes con factor no masculino, se debe preguntar cuáles serán los resultados en pacientes con factor masculino grave. - Muchos factores afectan el resultado del embarazo. Entonces, basado en el trabajo inicial de Berkowitz que indica que en los casos graves de factor masculino las tasas de

embarazo son más bajas. Además, de los elegantes artículos de Garolla y vanderzwalmen sobre patología de los espermatozoides, se puede concluir que existe un lugar para la selección de espermatozoides basada en la evidencia fisiológica de un solo espermatozoide.

Para realizar la IMSI y la selección de espermatozoides para cada caso de rutina, definitivamente no hay ninguna indicación. Pero en casos severos de factor masculino y teratozoospermia severa (morfología de patrón P) (El Khattabi et al. 2013), las observaciones iniciales de Berkowitz posiblemente sean correctas, y hay un lugar para que IMSI ayude a estas parejas. Por lo tanto, realizar una selección de espermatozoides con ácido hialorónico seguida de una evaluación cuidadosa de los espermatozoides (de Vos et al.) es un paso lógico para mejorar el resultado del embarazo en casos graves de factor masculino y en pacientes con teratozoospermia grave (patrón P de morfología de los espermatozoides).

## Referencias

1. Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, et al. *Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization*. *Fertility and Sterility* 2003;79(1):49.
2. Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A. *Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis* 2016; 32(3):286-298
3. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. *Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review* Published in: *Hum Reprod Update* 1998;4:73-82.
4. Deveneau NE, Sinno O, Krause M et al. *Impact of sperm morphology on the likelihood of pregnancy after intrauterine insemination* *Fertil Steril* 2014;102:1584-90
5. Donnelley ET, Lewis SEM, MacNelley JA. *In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome* *Fertil Steril* 1998 ; 70(2):305 - 314
6. Duran HE, Morshedi M, Kruger TF, et al. *Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success*. *Hum Reprod Update* 2002;8:373-84.
7. Erdem M, Gumuslu S, Kulak Det al *Sperm morphology before and after sperm preparation do not predict pregnancy in intrauterine insemination (IUI) cycles with husband sperm*. *Fertil Steril* 2009: 92 (3) S21
8. El Khattabi L, Dupont C, Sermondade N. *Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection effective in patients with infertility related to teratozoospermia or repeated implantation failure?* *Fertil Steril* 2013;100 (1): 62-68
9. Franken DR, Barendsen R, Kruger TF. *A continuous quality control program for sperm morphology*. *Fertil Steril* 2000;74(4): 721- 72.
10. Gorilla A, Fortini D, Menegazzo M, et al. *High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status*. *RBM Online* 2008;17(5):610.
11. Huzar G, Jacob A, Sakkas D et al. *Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects* *RBM Online* 2007;14 (5): 650
12. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, et al. *Sperm morphology as a prognostic factor in in vitro fertilization (IVF)* *Fertil Steril* 1986;46:1118-1123.
13. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, et al. *A quick reliable staining technique for sperm morphology*. *Arch Androl* 1987;18:275-277.

14. Kruger TF, Acosta AA, et al. A new method of evaluation sperm morphology with predictive value for IVF. *Urol* 1987;30:248.
15. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-117.
16. Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999;5:172-178.
17. Kruger TF. *Should ICSI be done for all IVF patients?* *MEFS Journal* 2009;14(2):85.
18. Lemmens L, S Kos, C Beijer. Predictive value of sperm morphology and progressively motile sperm count for pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2016;6:106:1462-1468
19. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TjvW, et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reprod* 1990;5:586-592.
20. Miller D, Pavitt S, Sharma V, Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): A parallel, two-group, randomised trial 2019 *The Lancet*: 393, (10170), 416-422,
21. Mokanszki A, Tothne EV, Bodnar B et al. Is sperm hyaloronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: *Systems Biol in Rep Med* 2014: 60 (6): 384-354
22. Montanaro Gauci M, Kruger TF, Coetzee K, et al.. *Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme.* *Andrologia* 2001;33:135-141.
23. Morbeck DE, Phoebe H, Leonard MD et al. Sperm morphology: classification drift over time and clinical implications. *Fertil Steril* 2011: 96 (6):1350-1354
24. Oehninger SC, Blackmore P, Morshedi M, et al.<sup>(a)</sup> *Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia.* *Fertil Steril* 1994; 61:349.
25. Oehninger SC, Acosta AA, Kruger TF, et al.. Failure of fertilization in *in vitro* fertilization: the "occult" male factor. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988;5:181.
26. Patounakis G, Richter KS, DeCherney A et al. Pre-wash sperm morphology predicts IUI outcomes by predicting post-wash total motile sperm count (TMSC): an analysis of 26,373 IUI cycles. *Fertil Steril* 2015;104 (3):239-240
27. Prinsoilova P, Kruger T, Sati L, et al. *Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology.* *RBM Online* 2009;18(2):177
28. Rajasingam S, Jeyendran B, Ettore C, Selecting the most competent sperm for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2019, 111 (5) 851-863
29. Roldan ERS. *Better intracytoplasmic sperm injection without sperm membranes and acrosome.* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2006;103(47):17585.
30. Teieira DM, Barbosa MAP, Ferriani RA et al.. Regular ICSI vesus IMSI spermselection for assisted reproduction. *Chochrane database* 2013 Volume 2013, Issue 7, 25 July 2013, Article number CD010167
31. Van den Hoven L, Hendriks J, Verbeet J. Status of sperm morphology assessment: an evaluation of methodology and clinical value *Fertil*

Steril 2015, 103 (1): 53-58

32. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, *et al.* Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *RBM Online* 2008;17:5617.
33. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, *et al.* Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;7:495-500.
34. World Health Organization: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus interaction. Press Concern: Singapore 1980:16.
35. Yang H, Pan B, Citation classics in Fertility and Sterility, 1975 – 2004. *Fertil Steril* 2006;86(4):795-797.

*Traducido, revisado y editado por el Biol. Gerardo Cerezo Parra.*



# ANÁLISIS DE CÉLULAS REDONDAS Y SEMEN: IMPORTANCIA Y DETERMINACIÓN

Stuart Dawe-Long

Fideicomiso de la Fundación NHS de la Universidad de Manchester, Manchester, Reino Unido.

Autor Corresponsal: Stuart Dawe-Long. Correo electrónico: [sbjlong@outlook.com](mailto:sbjlong@outlook.com)

Este capítulo revisará la importancia de las células redondas en la infertilidad masculina.

## Resumen

Las células redondas pueden brindarle al médico una comprensión de los posibles factores contribuyentes que pueden estar relacionados con la infertilidad masculina. Existen múltiples formas de detectarlas, aunque es necesario formar al servicio que la presta y verificar o validar adecuadamente la prueba diagnóstica. Se debe tener cuidado para construir un cuadro clínico del paciente antes de considerar cualquier tratamiento, ya que hay evidencia mínima para demostrar el uso de antioxidantes para mejorar las tasas de nacidos vivos. El equipo científico que observa la muestra e interactúa con el paciente masculino es clave para cerrar la brecha entre el paciente y el médico.

## Introducción

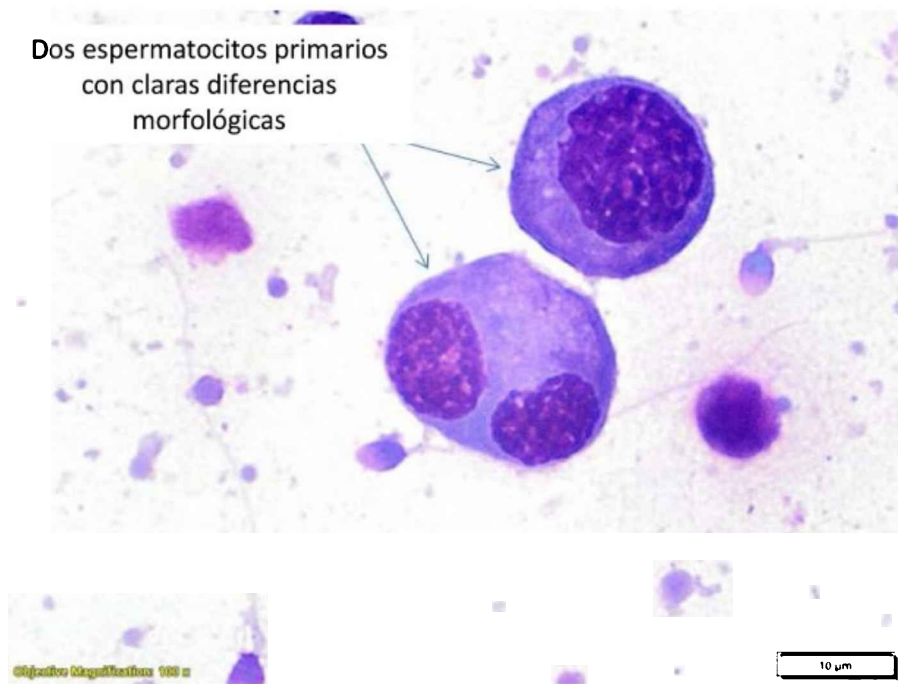
El análisis de semen es una herramienta increíblemente útil en las investigaciones de fertilidad y el manejo de intervenciones de pacientes para ciertas afecciones, como el hipogonadismo hipogonadotrófico. Sin embargo, a menudo hay una brecha en los resultados y la acción realizada por el médico. Es probable que esto pueda ser el resultado de una falta de comprensión, investigación académica o posiblemente una omisión de orientación por parte del servicio de diagnóstico.

El análisis de semen se ha guiado predominantemente por las publicaciones de diversos títulos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en esta área. La publicación más reciente fue la Sexta edición en el año 2021 (1), que logró un grado de avance con respecto a su predecesora de 2010 (2). Notablemente, hubo nuevamente el reconocimiento de lo que los andrólogos denominan "células redondas". Este es un término colectivo utilizado para describir las células germinales y los leucocitos detectados en el eyaculado (3-4). Se han realizado numerosos esfuerzos para considerar el impacto de la presencia de estas células, aunque notablemente más limitado a la categoría de leucocitos. Esto no sorprende, si se tiene en cuenta que su presencia puede ser indicativa de una respuesta inmunitaria, pero todavía hay una brecha en la comprensión de lo que significan estas células y cómo el laboratorio de diagnóstico puede ayudar al médico.

Este capítulo intentará abordar la importancia de las celdas redondas y el enfoque que puede adoptar un servicio de diagnóstico para apoyar al paciente y al médico.

## Tipos de células redondas

Es importante separar inicialmente los dos grupos de células redondas en células germinales inmaduras y leucocitos. La espermatogénesis normal implica el desarrollo de espermatozoides maduros a partir de una célula germinal primordial, dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Es importante comprender el proceso de espermatogénesis para apreciar la diferente presentación de células germinales inmaduras que pueden detectarse en el eyaculado. Los espermatozoides comienzan su desarrollo inicialmente, a partir de espermatogonias diploides que experimentan una replicación mitótica para dar lugar a un espermatocito primario. Los que continúan desarrollándose migran hacia la luz del tubo seminífero y sufren la meiosis I (que da lugar a espermatocitos secundarios haploides) y la subsiguiente meiosis II (que da lugar a espermátides haploides) (5). Siguen la espermiogénesis y la espermiación, que son los pasos finales en el proceso de mayor desarrollo de los espermatozoides. Durante estos procesos, las espermátides redondas se diferencian en regiones definidas (cabeza, pieza intermedia y pieza principal), se elimina el citoplasma sobrante y se desarrollan importantes aspectos funcionales de la región del acrosoma (5,6). Las células en cada etapa de la espermatogénesis tendrán muchas morfologías celulares similares, pero es importante tener en cuenta que puede haber un alto grado de pleomorfismo entre ellas, debido a la preparación de los portaobjetos de diagnóstico, la etapa de desarrollo y otros fenómenos naturales como la degeneración. Para demostrar las diferencias que a menudo se pueden observar, la **Figura 1** muestra dos espermatocitos en la misma distribución de morfología.



**Figura 1.** Morfología que compara las diferencias entre células germinales inmaduras.

La otra categoría de células redondas se origina a partir de los leucocitos (glóbulos blancos). Éstos se pueden dividir en dos linajes principales: mieloide y linfoide. La línea celular mieloide incluye los gránulos que contienen leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) mientras que la línea celular linfoide contiene células *natural Killer*, los linfocitos (*T helper*, *T* citotóxicos y tipo B) y células plasmáticas. Hay etapas de desarrollo para la producción de células sanguíneas (hematopoyesis) que pueden detectarse fácilmente en preparaciones de frotis de sangre, aunque es muy poco probable que se detecten en semen. Es importante comprender la inmunología básica con respecto a los leucocitos, ya que esto puede brindar información útil sobre el paciente junto con los hallazgos clínicos. La **Tabla 1** ofrece un resumen del papel que desempeñan estas células en una respuesta inmunitaria. Las funciones y la actividad de estas células dependerán del patógeno invasor (o enfermedad autoinmune) y pueden ser innatas, en las que existe un amplio enfoque no específico para la neutralización y eliminación de patógenos, o adaptativas, en las que el sistema inmunitario activa una respuesta específica al patógeno invasor (7,8).

**Tabla 1.** Roles de los leucocitos en la respuesta inmune.

<b>Leucocito</b>	<b>Tipo de inmunidad</b>	<b>Descripción</b>
Neutrofilo	Innata	La función principal es la fagocitosis y destrucción de microorganismos. También tiene una función inmunomoduladora.
Basofilo	Innata	Libera histamina, heparina, serotonina. Prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas. Puede aumentar la permeabilidad vascular (causando la contracción del músculo liso) y promover la producción de IgE.
Eosinofilo	Innata	Esta célula es más efectiva para la digestión extracelular de patógenos que serían demasiado grandes para ser absorbidos.
Mastocito	Innata	Célula tisular que reside entre los tejidos y el medio ambiente. Desempeña un papel clave en las reacciones alérgicas y las infecciones parasitarias. Puede activarse para iniciar la liberación de histamina y citoquinas, así como la liberación de mediadores de lípidos.
Linfocito T	Adaptiva	De manera simplista, reconoce antígenos en las superficies celulares y los destruye. Se puede dividir en Th1 y Th2, dependiendo de su producción de citoquinas. Modula la respuesta inmune, específica al antígeno (patógeno). También ayuda en el reclutamiento de células T citotóxicas.
Linfocito B	Adaptiva	Esta célula tiene anticuerpos unidos a la membrana (inmunoglobulinas) que se unen al material no propio invasor. Una vez activado (antígeno unido al epítipo), se producirá la replicación y la diferenciación, convirtiéndose en células de memoria y células plasmáticas.

<p>Celula Plasmática</p>	<p>Adaptiva</p>	<p>Una célula productora de anticuerpos, que es un linfocito B completamente diferenciado. Los anticuerpos son importantes ya que se unen a los patógenos y causarán opsonización y reducción de la funcionalidad del patógeno invasor.</p>
--------------------------	-----------------	---

### ¿Qué puede causar “células redondas” en el semen?

Bajo el paraguas de las "células redondas", las células germinales inmaduras parecen contribuir a la mayoría de las células detectadas, y se estima que el 84 % de las células no espermáticas pertenecen a esta categoría (9). Existe la sugerencia de que la detección de células germinales puede deberse a una terminación espermiogénica fallida o a una regeneración activa del epitelio (4). La regeneración activa puede deberse a ataques transitorios de patógenos, como el virus de influenza (3). Otra explicación considera que puede haber un aumento en la eliminación de células germinales con la detención de la maduración testicular (10). La detención de la maduración a veces se puede diferenciar por el nivel de desarrollo de la línea de células espermáticas, es decir, la detención de la maduración tardía impide el desarrollo más allá de la etapa espermática redonda (10).

Existen otras condiciones clínicas que pueden dar lugar a un aumento de células germinales/espermatozoides inmaduros que incluyen criptorquidia (testículos no descendidos) y varicoceles. Existe una gran cantidad de evidencia del impacto de la criptorquidia en la fertilidad, particularmente cuando hay un retraso en el tratamiento, como con la orquidopexia. Hay algunas pruebas emergentes de que, en algunos pacientes, el proceso de autofagia (eliminación de células dañadas) en pacientes con criptorquidia (o pacientes tratados de inicio tardío) conduce a una población inmadura de espermatozoides (11).

Un varicocele es una dilatación anormal de las venas, particularmente en el plexo pampiniforme (red venosa que drena la sangre de los testículos). En estos pacientes, la maduración y función de los espermatozoides parece estar obstaculizada. El mecanismo de acción exacto de esto todavía está en discusión, aunque se acepta que como mínimo, un aumento en el flujo sanguíneo y la posterior acumulación alrededor de los testículos conduce a un aumento de la temperatura intratesticular (12). También hay evidencia de un nivel mayor de estrés oxidativo (aparte de un aumento en la incidencia de células germinales inmaduras) y leucocitos debido a una combinación de aumento en la presión hidrostática, formación de toxinas, hipoxia y autoinmunidad (13). El estrés oxidativo se analiza con más detalle más adelante en este capítulo.

Los leucocitos deben analizarse en términos de su función inmunológica general en el cuerpo humano para poder comprender la posible causa de su presencia en el semen. La presencia de leucocitos en semen es clínicamente relevante y posiblemente indicativo de un proceso inflamatorio, infección genitourinaria (GU) o infección de glándulas accesorias cuando hay  $>1,0 \times 10^6$  leucocitos por ml (14,15). Cuando las concentraciones de leucocitos superan este nivel, se denomina leucocitospermia. La respuesta a la infección depende del patógeno invasor y puede provocar múltiples reacciones del sistema inmunitario. En el caso de una infección bacteriana, se inician tres respuestas inmunitarias principales: la vía del complemento; iniciación de fagocitos e inmunidad mediada por células (16). Muchas infecciones bacterianas del tracto urinario (ITU) inician la infiltración de neutrófilos como defensa de primera línea. Los neutrófilos son células extremadamente activas que se clasifican como granulocitos y migran al sitio de la infección, ingiriendo patógenos y apoyando la respuesta inmune más amplia. Los neutrófilos son mucho más complicados de lo que parecen en la superficie y tienen mecanismos químicos complejos que se utilizan para atacar a los patógenos fagocitados. Las múltiples funciones de los neutrófilos se resumen en la **Figura 2** (17,18), aunque esto solo toca la superficie de sus acciones.

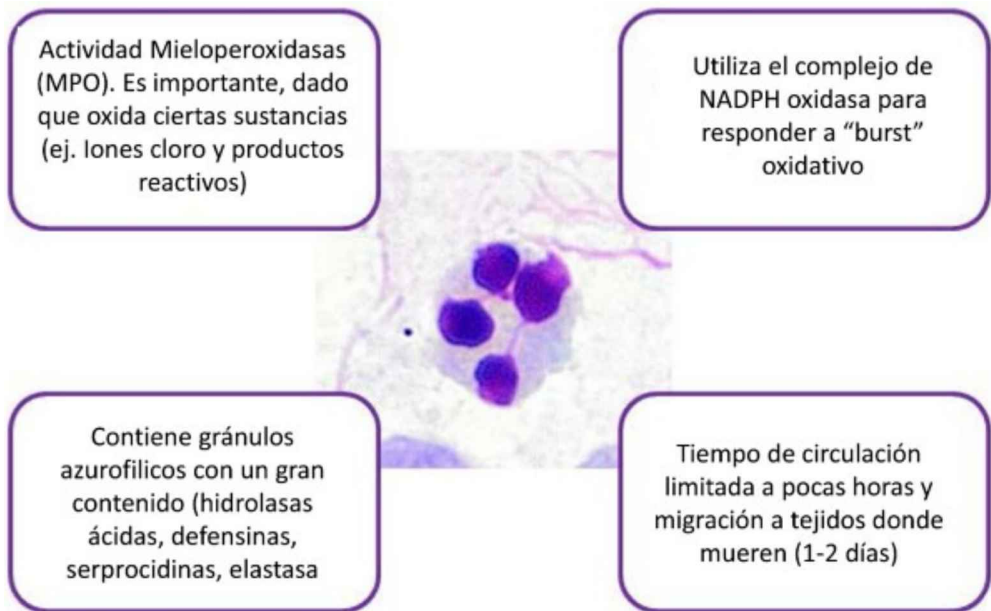


Figura 2. Acción de los neutrófilos en una respuesta inmune.

La producción resultante de superóxidos es un factor importante que contribuye a las especies reactivas de oxígeno en el fluido seminal. Otra infección relativamente común es la prostatitis bacteriana, que puede ser causada por especies de *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Serratia* (19). La causa más común de prostatitis bacteriana es por *E.coli* (>50 % de todas las causas) (20) y también es uno de los principales contribuyentes a las infecciones de las glándulas accesorias masculinas (MAGI). En casos de MAGI o infiltración bacteriana, puede dar lugar a complicaciones adicionales, como la obstrucción, la inflamación de los testículos (orquitis) y problemas de producción de líquido seminal (21). Esto conducirá a una afluencia de leucocitos que probablemente se infiltrarán en el tracto urogenital y se detectarán en el semen eyaculado. Esto por sí solo no puede correlacionarse directamente con la causa de MAGI o infertilidad, pero se estima que hay un 15 % de casos en los que existe un vínculo conocido (22). Hay patógenos adicionales que pueden dar lugar a MAGI, incluidos *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoea* y *Chlamydia trachomatis* (21).

Es importante señalar que en la mayoría de los casos en los que se encuentra leucocitospermia, no se detecta infección microbiana. Es importante comprender que esto puede depender en gran medida del mecanismo de prueba aplicado, es decir, las pruebas de PCR dirigidas serán más beneficiosas que las pruebas microbiológicas generales en la eyaculación.

Las infecciones virales se discuten menos en la investigación, aunque se sabe más sobre el impacto de estas en la salud general y el impacto que pueden causar los síntomas. La influenza, por ejemplo, ha sido investigada exhaustivamente por su impacto en la calidad del semen, específicamente debido al hecho de que causa fiebre en muchos pacientes. Existe evidencia que muestra la presencia de células redondas en el semen luego de una fiebre (23) y vínculos limitados específicamente con la presencia de leucocitos en el semen humano luego de infecciones virales generales (24,25). Las infecciones virales pueden conducir a varias respuestas inmunitarias, incluida la iniciación de la proteína del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC clase I) y la destrucción por las células T citotóxicas, reclutamiento de células asesinas naturales (para cuando los virus evaden la vía del complejo MHC Clase I), producción de interferón, anticuerpos y fagocitosis (26). Se requiere más investigación en este campo para

comprender la migración de los leucocitos y el impacto en las capas de células germinales después de las infecciones virales.

Los últimos elementos a considerar son el período de tiempo entre las eyaculaciones de un paciente y el aumento del consumo de drogas recreativas y de tabaco. Existe alguna evidencia de que un paciente puede tener una concentración reducida de espermatozoides maduros y una mayor cantidad de células germinales inmaduras si tiene un trastorno de masturbación compulsiva (27). Esto debe discutirse con el paciente para determinar si se debe a razones psicológicas o si hay un malentendido con respecto a los criterios previos al examen. No obstante, esto debe ser una consideración como fuente de células germinales dentro del líquido seminal. Fumar se ha asociado con un aumento en el número de leucocitos durante algún tiempo, también hay un aumento en la posibilidad del uso de otras drogas como el cannabis en la producción de células redondas (esto requiere más investigación para determinar si esto es significativo).

### DetECCIÓN DE CÉLULAS REDONDAS

La evaluación morfológica de las preparaciones teñidas puede ser una herramienta útil en los recuentos diferenciales de células (4), aunque esto puede tener algunos inconvenientes que deben sortearse con cuidado. Hay muchas similitudes entre los tipos de células que pueden ser difíciles de distinguir según la calidad de la preparación, la fijación previa a la tinción, el tipo de tinción, el protocolo de tinción y el científico que realiza la revisión. El procedimiento de tinción recomendado según la OMS 2021 (1) es un Papanicolaou modificado (PAP), que se utiliza a menudo en preparaciones citológicas. Este método reduce el artefacto de fondo y brinda un mayor grado de reconocimiento de anomalías en los espermatozoides en comparación con otros métodos como el Romanowsky rápido. Esto incluye la mejora en la detección de anomalías citoplasmáticas sutiles que a menudo se pueden omitir en la tinción de Romanowsky.

En hematología, el método de elección para frotis de sangre periférica es Romanowsky debido a la capacidad de la tinción para mostrar detalles, policromasia (múltiples colores) y mostrar los gránulos de células individuales sin sobretinción (28). Los puentes nucleares son claramente visibles entre los lóbulos de los neutrófilos con la tinción de Romanowsky, lo que a menudo puede ser difícil de detectar en los portaobjetos teñidos con PAP. Las características morfológicas de las células redondas se pueden usar para distinguir entre diferentes tipos de células (consulte la **Tabla 2**) (1,4,17,29) aunque, como se indicó anteriormente, esto puede variar según muchos factores y se debe tener cuidado durante el diagnóstico para diferenciar estos tipos de células.

**Tabla 2.** Descripciones morfológicas de los leucocitos y células germinales.

Célula	Tamaño (µm)	Características
<b>Leucocitos</b>		
Neutrófilo	8 - 15	Generalmente circular, con un núcleo multilobulado único que tiene "puentes" delgados entre cada lóbulo. El número de lóbulos puede diferir, pero suele estar entre 3 y 5 µm. Los gránulos en el citoplasma son azurófilos.

Basófilo	10 - 15	El núcleo es bilobulado y contiene gránulos densos que a menudo se tiñen de azul. Raramente visto en sangre periférica y aún más raro en semen.
Eosinofilo	10 - 17	Estos contienen un núcleo segmentado/bilobulado con gránulos acidófilos (se tiñen más de rojo/rosado)
Macrofago	10 - 30	Núcleo grande de aproximadamente 6 - 12 $\mu\text{m}$ y un citoplasma que contiene vacuolas y gránulos. También puede haber material engullido en el citoplasma. Gránulos basófilos.
Linfocito	6 - 9	El núcleo es ovalado y, a menudo, puede ocupar una gran proporción del espacio citoplasmático. Las versiones más grandes pueden ser células plasmáticas (más citoplasma). No se encuentran gránulos en estas células.
<b>Células germinales</b>		
Spermatogonia	8 - 10	Citoplasma mínimo y núcleo redondo. El núcleo tiende a ser de naturaleza lisa y puede haber 1 o 2 nucléolos presentes. El núcleo tiene un tamaño aproximado de 8 $\mu\text{m}$ .
Espermatocito Primario	10 - 20 aprox	Células grandes con núcleo más grande y a menudo cromatina densa/moteada. La apariencia de la cromatina se ve afectada por la etapa de división meiótica.
Espermatocito Secundario	10 - 15 aprox	Estos son más pequeños que los espermatocitos primarios (que se encuentran con menos frecuencia) y están redondeados con una tinción a menudo más profunda. La cromatina se ve menos moteada que en los espermatocitos primarios.

Espermátide	Sin tamaño promedio, pero el núcleo mide aproximadamente 5 µm	La morfología es muy variable, dependiendo de la etapa de maduración. Cromatina densa (se ve teñida de oscuro y más pareja). Puede haber gránulos presentes pero, más comúnmente, el núcleo es excéntrico. Puede haber múltiples núcleos en un área del citoplasma.
-------------	---	---

La diferenciación simple utilizando portaobjetos teñidos solo puede ser realizada por científicos capacitados y competentes después de la validación de los protocolos de tinción. El grado de capacitación y lo que se clasifica como competencia suficiente puede ser difícil de determinar ya que no existe un *gold standard* para usar, por lo tanto, las estimaciones deben limitarse a categorías amplias en lugar de recuentos diferenciales para tipos de células individuales. Las imágenes relacionadas con los portaobjetos teñidos están disponibles a través de artículos publicados (4,29) que se pueden utilizar para apoyar la formación y la identificación.

Las directrices o guías y los artículos se concentran en la detección de células positivas para peroxidasa para la diferenciación de células redondas (1,22). Si bien esto es vital para la detección de algunos leucocitos, no detectará células que no contienen peroxidasa, como linfocitos, monocitos y granulocitos activados (los que han liberado su contenido). También perderá la identificación de las células germinales, omitiendo la capacidad de detectar el cese de la espermatogénesis en un nivel particular. Existen múltiples métodos que se pueden usar para detectar leucocitos en el semen, incluida la inmunocitoquímica (CD45), la positividad de la peroxidasa y la prueba de elastasa de granulocitos (22). La más utilizada es la prueba de la peroxidasa, en la que la MPO oxida el 4-cloro-1-naftol (4-CN) en un precipitado, utilizando peróxido de hidrógeno como oxidante (22). Esto da una mancha azul-púrpura que es más reconocible como un tono marrón bajo el contraste de fase cuando se usa una contratinción. Hay otras tinciones de peroxidasa recomendadas, como la prueba de orto-toluidina dada en la OMS 2021 (1). Hay kits de prueba que se pueden comprar para respaldar el uso simplificado de la prueba de peroxidasa, pero aún se deben considerar las limitaciones mencionadas anteriormente al usar estos reactivos.

Otra prueba (denominada *gold standard*) es la inmunocitoquímica, que puede diferenciar entre las células germinales y todos los tipos de leucocitos. El principio es que todos los leucocitos expresan el antígeno CD45 que puede detectarse mediante el uso de anticuerpos monoclonales (1). El procedimiento implica una contratinción (hematoxilina), varias soluciones tampón, incubación con dos anticuerpos y fijadores antes de que se lleve a cabo la evaluación. Esto no es factible para los diagnósticos cotidianos, ya que es un proceso extenso, complicado y costoso.

Los últimos tipos de prueba para una breve discusión incluyen la prueba de interleukinas y la prueba de elastasa. Las interleukinas (IL) son básicamente un grupo de citoquinas que son producidas por las células del sistema inmunitario (pero también pueden ser producidas por otras células del cuerpo) para orquestar múltiples respuestas inmunitarias. La presencia de IL puede sugerir una respuesta inflamatoria que puede ser causada por prostatitis u otras infecciones del tracto genital masculino. Hay fuentes conocidas y propiedades biológicas de IL que pueden ser importantes en la comprensión para respaldar el cuadro clínico. Se puede usar un ejemplo de la producción de IL-8 por macrófagos para inducir el traslado de los neutrófilos al sitio de producción (un factor quimiotáctico) (30). Es importante comprender que hay una serie de kits comerciales disponibles para cubrir numerosas IL y estos pueden adaptarse para su uso en semen si se realizan las validaciones adecuadas.

La elastasa es una enzima liberada por granulocitos como los neutrófilos durante una respuesta inflamatoria (31). Específicamente, el complejo inhibidor de elastasa- $\alpha$ 1-proteasa (Ela/ $\alpha$ 1-PI) se sugiere como la proteína que se medirá mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y tiene una fuerte correlación con la actividad de las células polimorfonucleares (PMN) y la actividad genital. infección del tracto/prostatitis crónica (22, 31). Los límites de referencia inferiores sugeridos incluyen 230 µg/L y 290 µg/L (22, 31) para corresponder con la



actividad de los leucocitos. Las limitaciones de esta prueba incluyen tiempo y gastos adicionales (para una prueba ELISA). También es más adecuado para la detección de infecciones/inflamaciones subclínicas, aunque puede ser una herramienta útil junto con la calidad del espermatozoide y los hallazgos clínicos.

### **Impacto de las células redondas en la fertilidad**

El estrés oxidativo (OS) es donde el equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad fisiológica del cuerpo para eliminarlas/neutralizarlas ha fallado. Las ROS son agentes oxidantes que contienen electrones desapareados que pueden reaccionar con otros compuestos. Incluyen radicales libres de anión superóxido, radicales de óxido nítrico y radicales hidroxilo, así como compuestos no radicales como el peróxido de hidrógeno (32, 33). Las ROS se han asociado como un factor que contribuye a la infertilidad por factor masculino en aproximadamente un 30 a 80 % de los pacientes (34), aunque estas estimaciones pueden variar mucho entre los estudios.

Los espermatozoides pueden producir ROS y se han asociado con células anormales/inmaduras con exceso de citoplasma residual y con células germinales inmaduras (32), aunque se acepta ampliamente que los leucocitos y los espermatozoides anormales son la mayor fuente de ROS (35). Es probable que las células liberadoras de MPO y otros leucocitos productores de superóxido sean los principales contribuyentes a la producción excesiva de ROS y la subsiguiente OS. Estas se conocen como células positivas a la peroxidasa, que a menudo son el objetivo de las pruebas de laboratorio para detectar leucocitos. El grado de importancia clínica específicamente relacionado con el número de leucocitos no es fácil de determinar, ya que éste puede depender de su número, si están activos, el número de espermatozoides presentes en correlación con el número de leucocitos y la ubicación de la infección (1). Sin embargo, hay evidencia que correlaciona la presencia de leucocitos con una disminución en la calidad del semen, daño en el ADN y mala motilidad (1,36).

El equilibrio de ROS es importante ya que en el nivel óptimo puede respaldar la función del espermatozoide (capacitación y reacción del acrosoma), pero en niveles anormales puede causar daño en el ADN, reducción de la motilidad del espermatozoide, peroxidación de lípidos y apoptosis (37). La peroxidación lipídica puede ocurrir debido a que los espermatozoides típicos maduros tienen una cantidad relativamente pequeña de citoplasma, una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y una baja actividad antioxidante, lo que conduce a una disfunción de la reacción acrosomal, que se requiere para la fertilización (38). El proceso bioquímico de peroxidación se basa en el hecho de que los PUFA contienen un doble enlace adyacente a un grupo metileno, lo que debilita el enlace metileno-carbono-hidrógeno. Esto puede provocar que los radicales libres ataquen el hidrógeno, dejando un electrón desapareado en el ácido graso que es susceptible de oxidación (37).

El daño del ADN es un área próxima de la fertilidad y está interrelacionado con ROS, ya que se sabe que causa modificaciones en las bases de los ácidos nucleicos y altera la integridad del ADN (39). Las pruebas de daño en el ADN (también conocidas como fragmentación de espermatozoide) pueden usarse como resultado de la detección de células redondas, pero no están necesariamente correlacionadas, es decir, la leucocitospermia puede no ser la causa del daño en el ADN.

En este capítulo se mencionó anteriormente que puede haber implicaciones clínicas adicionales fuera de la producción de ROS de células redondas que es importante para la fertilidad, como la obstrucción del conducto eyaculador debido a la infiltración bacteriana. Los primeros signos de esto pueden detectarse en el plasma seminal a través de la diferenciación de células redondas para que se puedan llevar a cabo análisis e investigaciones clínicas adicionales. En este capítulo se han discutido las causas bacterianas de la infección, que pueden afectar directamente la función de los espermatozoides (40), aumentar la producción de ROS o causar inflamación. Muchas de estas infecciones pueden ser asintomáticas y pueden volverse más avanzadas y problemáticas con el tiempo. Cuando se detectan leucocitos en el semen, se estima que entre el 50 y el 80 % de los casos no se pueden detectar bacterias en el semen mediante pruebas generales amplias mediante microscopía, cultivo y sensibilidad (MC&S) (41). Los problemas funcionales directos con la calidad del semen incluyen una motilidad reducida y posiblemente la morfología, ya que algunos estudios han sugerido mejoras en estos parámetros después del tratamiento (40).

## Información científica sobre los informes de celdas redondas

Es justo afirmar que la identificación de células en la muestra de semen puede conducir a una comprensión de las infecciones actuales, activas o pasajeras junto con información sobre la espermatogénesis y, al mismo tiempo, considerar los factores del estilo de vida que pueden afectar negativamente a la fertilidad (4). Los criterios de preexamen y los datos demográficos básicos se utilizan generalmente para la aceptación de muestras de semen para la investigación en diagnósticos de infertilidad. En realidad, esto no logra recopilar suficiente información para interpretar clínicamente los resultados del análisis de semen o dirigir al médico remitente para el manejo adecuado. No es recomendable suponer que el remitente es un experto en el campo de la andrología ya que esto puede provocar un retraso en la investigación, el tratamiento o el manejo incorrecto de la pareja.

El equipo científico responsable del diagnóstico debe considerar un cuestionario relativamente detallado junto con la recolección de muestras. Esto se cubrió extensamente en Long et al., (4) pero debería incluir lo siguiente:

- Requisitos previos al examen de acuerdo con las directrices actuales de la OMS (vital para la interpretación de todos los parámetros)
- Con qué frecuencia el paciente se masturba o participa en actividades sexuales que resultan en la eyaculación
- Si ha habido alguna enfermedad en los últimos tres a seis meses (esto podría ser más específico/extendido según la respuesta), se deben solicitar enfermedades y síntomas febriles.
- Si el paciente ha sido intervenido quirúrgicamente, incluyendo abdomen inferior, región genital y retroperitoneal
- Si el paciente ha tenido cáncer, el tratamiento del cáncer, incluida la quimioterapia, es posible que los agentes quimioterapéuticos hayan tenido un impacto. Algunos pacientes también pueden revelar cánceres específicos masculinos.
- Si el paciente bebe alcohol, fuma tabaco, toma algún tipo de droga recreativa (cannabis, esteroides, cocaína, etc.).
- Si el paciente toma algún medicamento recetado o no.

La muestra de semen debe analizarse dentro de los 60 minutos posteriores a la producción para garantizar que se dé el tiempo adecuado para parámetros como la licuefacción, el pH, la viscosidad, la motilidad y la vitalidad. Esto es vital para garantizar que se proporcionen resultados precisos al médico que informa. El laboratorio debe asegurarse de que el método elegido de identificación de células redondas se aplique a la muestra y que el resultado se tenga en cuenta con la información clínica previa. Es suficiente realizar un diferencial "crudo" teñido donde hay  $>1,0$  millón de células redondas por ml. En este caso, las células redondas se pueden identificar en dos categorías; células germinales o leucocitos. Una vez hecho esto, una revisión de la información clínica puede generar una imagen para el científico que debe respaldar el informe final.

A continuación se dan dos ejemplos para demostrar la utilidad de este proceso:

**Escenario 1:** *el paciente tiene una concentración espermática de  $0,1 \times 10^6/ml$ , 10% motilidad progresiva total y 1% formas normales. Tuvieron una evaluación de vitalidad que indicó un 60% de espermatozoides vivos. Parecía haber células redondas que se diferenciaron y mostraron  $>1,0 \times 10^6/ml$  de leucocitos. Se habían abstenido de tener relaciones sexuales durante 2 días, recolectaron una muestra completa y la produjeron en el lugar donde se controló la temperatura de la muestra. La revisión clínica indicó que habían sido investigados por dolor lumbar y dificultad general/dolor al orinar. Manifestaron que no ha tenido ninguna cirugía, no tiene enfermedades febriles recientes y no toma medicamentos recetados ni drogas recreativas.*

**Revisión científica 1:** *debe haber un informe de los hallazgos, incluida la garantía de que el médico sepa que se cumplieron los criterios previos al examen. El informe debe mencionar la diferenciación y afirmar que la mayoría de estas células redondas eran leucocitos. Comentarios adicionales que deben considerarse, como "la presencia de leucocitos y síntomas de una posible*

*infección del tracto genital masculino pueden justificar una mayor investigación. Considere diagnósticos específicos para posibles infecciones según el historial del paciente o considere MC&S. No es aconsejable tratar a este paciente basándose únicamente en este hallazgo". También se debe considerar la posibilidad de repetir el análisis.*

**Escenario 2:** *el paciente tiene una concentración de espermatozoides de  $17,1 \times 10^6/ml$ , 34% motilidad progresiva total y 1% formas normales. Parecía haber células redondas que estaban diferenciadas y mostraban una población mixta  $>1,0 \times 10^6/ml$  de células germinales y leucocitos. Se habían abstenido de tener relaciones sexuales durante 2 días, recolectaron una muestra completa y la produjeron en el lugar donde se controló la temperatura de la muestra. Sin información clínica de apoyo adversa. No uso de drogas recreativas.*

**Revisión científica 2:** *debe haber un informe de los hallazgos, incluida la garantía de que el médico sepa que se cumplieron los criterios previos al examen. El informe debe mencionar la diferenciación y afirmar que la mayoría de estas células redondas eran células germinales y leucocitos. Comentarios adicionales que deben tenerse en cuenta, como "no hay información clínica que respalde este hallazgo. No trate solo con este hallazgo. Considere repetir el análisis de semen". El proceso de diagnóstico real diferirá según el entorno de atención médica y los recursos disponibles, incluidos los marcadores específicos utilizados para respaldar la investigación clínica. Puede haber un requisito para derivar al paciente a una clínica especializada en salud sexual para garantizar que cualquier infección contagiosa esté sujeta al rastreo de contactos, o el paciente puede requerir escaneos de sus glándulas accesorias y próstata. Nunca se debe sugerir un tratamiento a menos que se identifique la confirmación de una causa o si el médico tiene evidencia para sugerir que el paciente se beneficiaría del tratamiento. Esto puede respaldar el uso de tecnología de reproducción asistida (ART) o puede allanar el camino para repetir el análisis en un momento posterior una vez que se haya completado el tratamiento y se haya completado la espermatogénesis en aproximadamente 65 a 72 días.*

## Referencias

1. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th Edn. Geneva: World Health Organisation (2021).
2. WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th Edn. Geneva: World Health Organisation (2010).
3. Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Cheung S, Pereira N, Rosenwaks Z. Shedding Light on the Nature of Seminal Round Cells (2016). PLoS One. Mar 16;11(3):
4. Long S, Kenworthy S (2022). Round Cells in Diagnostic Semen Analysis: A Guide for Laboratories and Clinicians. British Journal of Biomedical Science. Vol. 79
5. Allais-Bonnet A, Pailhoux E (2014). Role of the prion protein family in the gonads. Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol 2.
6. Mortimer D, Björndahl L, Barratt C, Castilla J, Menkveld R, Kvist U, Alvarez J and Haugen T. A practical guide to basic laboratory andrology. Cambridge: Cambridge University Press; 2010; pp.5-17.
7. Shohei K, Ken I, Cevayir C, Shizuo A (2008). Innate immune response to viral infection, Cytokine, 43 (3).
8. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. Cell Host Microbe. 9;25(1):13-26.
9. Smith DC, Barratt CL, and Williams MA (1989). The Characterisation of Non-sperm Cells in the Ejaculates of fertile Men Using Transmission Electron Microscopy. Andrologia, 21(4):319-33.

10. Halder A, Kumar P, Jain M, and Iyer VK (2017). Copy Number Variations in Testicular Maturation Arrest. *Andrology*, 5(3):460–72.
11. Yefimova G, Buschiazzo A, Burel A, Lavault M T, Pimentel C, Jouve G, Jaillard S, Jegou B, Bourmeyster N & Ravel C. (2019). Autophagy is increased in cryptorchid testis resulting in abnormal spermatozoa. *Asian J Androl. Dec*;21(6):570-576.
12. Vaganée D, Daems F, Aerts W, Dewaide R, van den Keybus T, De Baets K, De Wachter S, De Win G (2018). Testicular asymmetry in healthy adolescent boys. *BJU Int*, Oct;122(4):654-666.
13. Leslie S, Sajjad H, Siref LE (2022). Varicocele. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
14. Brunner RJ, Demeter JH, and Sindhwani, P (2019). Review of Guidelines for the Evaluation and Treatment of Leukocytospermia in Male Infertility. *World J Mens Health*, 37(2):128–37.
15. Sandoval, JS, Raburn, D, and Muasher, S. (2013). Leukocytospermia: Overview of Diagnosis, Implications, and Management of a Controversial Finding. *Middle East Fertil Soc J*, 18(3):129–34.
16. Bellanti JA (1989). Cell-Mediated Immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 84(6 Pt 2):1036–9.
16. Todd I and Spickett G., 2008. *Immunology*. Malden, MA: Blackwell Publishing.
17. Winterbourn CC, Kettle AJ, and Hampton MB (2016). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*, 85(1):765–92.
18. Coker TJ and Dierfeldt DM (2016). Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*, 93(2):114–20.
19. Etienne M, Chavanet P, Sibert L, et al (2008). Acute bacterial prostatitis: heterogeneity in diagnostic criteria and management. Retrospective multicentric analysis of 371 patients diagnosed with acute prostatitis. *BMC Infect Dis*. 2008;8:12.
20. Krause W (2008). Male Accessory Gland Infection. *Andrologia*, 40(2):113–6.
21. Sharma R, Gupta S, Agarwal A, et al (2022). Relevance of Leukocytospermia and Semen Culture and Its True Place in Diagnosing and Treating Male Infertility. *World J Mens Health*, 40(2):191-207.
22. Sergerie M, Mieuxset R, Croute F, Daudin M and Bujan L (2007). High Risk of Temporary Alteration of Semen Parameters after Recent Acute Febrile Illness. *Fertil Steril*, 88(4):970–7.
23. Fedder J (1996). Nonsperm Cells in Human Semen: With Special Reference to Seminal Leukocytes and Their Possible Influence on Fertility. *Arch Androl*, 36(1):41–65.
24. Li H, Xiao X, Zhang J, Zafar MI, Wu C, Long Y., et al (2020). Impaired Spermatogenesis in COVID-19 Patients. *Eclinical Medicine*, 28:100604.
25. Koyama S, Ishii KJ, Coban C and Akira S (2008). Innate Immune Response to Viral Infection. *Cytokine* , 43(3):336–41.
26. Mayorga-Torres BJM, Camargo M, Agarwal A, du Plessis SS, Cadavid ÁP and Cardona Maya WD (2015). Influence of Ejaculation Frequency on Seminal Parameters. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(1):47.
27. Horobin RW (2011). How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem*, 86(1):36-51.

28. Johannisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A (2000). Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study, *Human Reproduction Update*, Volume 6, Issue 4, 1, PP 404-412, <https://doi.org/10.1093/humupd/6.4.404>
29. Quimby FW and NV Ridenour (1994). The immune system: Red cell agglutination in nonhumans. Pages 141-164, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 15 (C. A. Goldman, Editor). Proceedings of the 15th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)
30. Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H (2000) Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation, *Human Reproduction*, Volume 15, Issue 9, Pages 1978-1984, <https://doi.org/10.1093/humrep/15.9.1978>
31. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*, 86(4):878-85.
32. Halliwell B (1993). Free radicals and vascular disease: how much do we know? *BMJ*. 9;307(6909):885-6. doi: 10.1136/bmj.307.6909.885. PMID: 8241848; PMCID: PMC1679042.
33. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*. 14:470-485
34. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, Greco E (2015). Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*, 3(2):265-70.
35. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG (2002). Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 78(6):1215-24.
36. Balercia, Gandini L, Lenzi A and Lombardo F, n.d. Antioxidants in *Andrology*. 1st ed. Switzerland: Springer International, 2017, pp.1 - 15.
37. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2(1):48-54.
38. Sharma RK, Said T, Agarwal A (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*, 6(2):139-48..
39. Skau PA, Folstad I (2003). Do bacterial infections cause reduced ejaculate quality? A meta-analysis of antibiotic treatment of male infertility. *Behav Ecol*, 14:40-47.
40. Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, De Leo V and Piomboni P (2007). Sperm Quality and Pregnancy Rate after COX-2 Inhibitor Therapy of Infertile Males with Abacterial Leukocytospermia. *Hum Reprod*, 22(4):1047-51.

*Traducido y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# ORIGEN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO: PAPEL DE LA APOPTOSIS, LA INMADUREZ Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Lara Tamburrino

Sara Marchiani<sup>1</sup>

Monica Muratori<sup>1</sup>

Elisabetta Baldi

Departamentos de Medicina Clínica y Experimental y Ciencias Biomédicas Clínicas y Experimentales "Mario Serio"<sup>1</sup>,  
Universidad de Florencia, Florencia, Italia.

Autor Corresponsal: Elisabetta Baldi. Correo electrónico: [elisabetta.baldi@unifi.it](mailto:elisabetta.baldi@unifi.it)

## Cápsula

La fragmentación del ADN espermático es la anomalía del ADN más frecuente presente en la gameta masculina, mayor en hombres subfértiles, que puede tener varios factores desencadenantes que generan el daño a través de diferentes mecanismos.

## Introducción

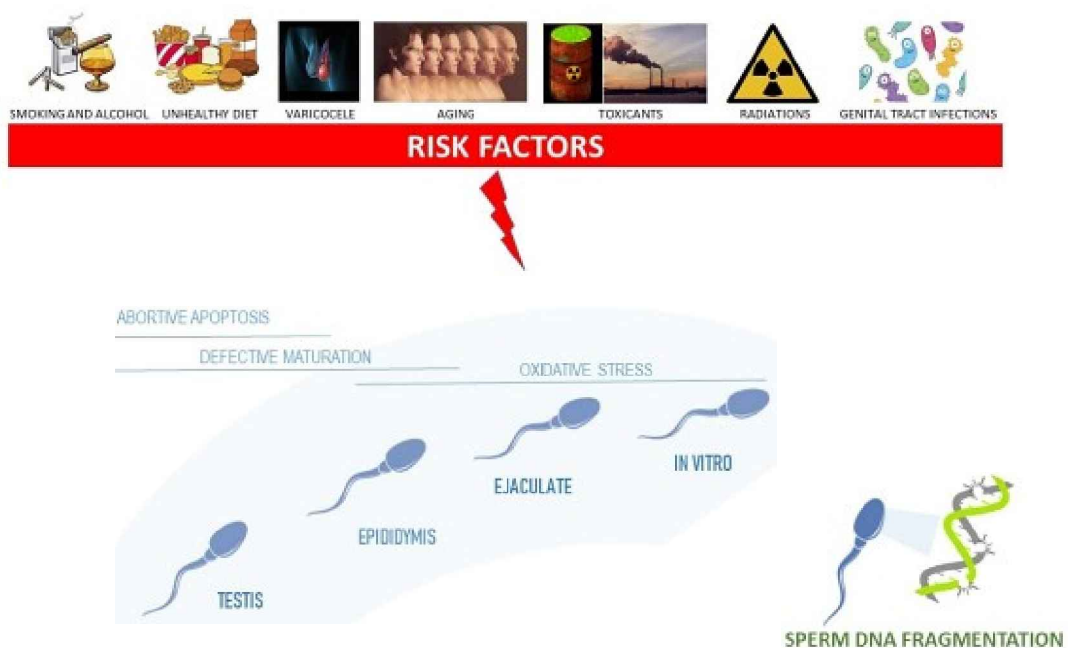
La infertilidad afecta a alrededor del 15 % de las parejas del mundo (1) y el factor masculino, que ha aumentado en las últimas décadas, contribuye al 50 % de los casos (2-4). Actualmente, la principal herramienta para la evaluación de rutina de la infertilidad masculina se considera el análisis del semen, que, sin embargo, es poco predictivo del estado de fertilidad, ya que descuida aspectos muy importantes para una fecundación exitosa, el desarrollo del embrión, la implantación y los embarazos, como la integridad del ADN espermático (5-9). Los trastornos del ADN de la gameta masculina incluyen aberraciones cromosómicas (principalmente deleciones y aneuploidías), modificaciones epigenéticas en las colas de las histonas y el ADN, mutaciones, oxidación de bases y fragmentación del ADN espermático (SDF). El SDF consiste en las roturas de una o dos cadenas de ADN, y es la anomalía más frecuente en el ADN de los espermatozoides. Este daño es más frecuente en pacientes subfértiles, y puede afectar a un alto porcentaje de espermatozoides en un eyaculado (10) y puede estar solo parcialmente relacionado con la calidad del semen (11,12).

La demostración de que un espermatozoide con ADN fragmentado puede fecundar al ovocito (13) generó preocupación en la comunidad científica. De hecho, aunque el ovocito tiene la capacidad de reparar el daño, este mecanismo compensatorio depende en gran medida de la calidad del ovocito y, por lo tanto, puede fallar y provocar un desarrollo defectuoso del embrión temprano (14). Una revisión reciente proporciona evidencia sólida de una asociación negativa entre el daño en el ADN del espermatozoide y los resultados de la fertilización in vitro y, en particular, con la tasa de embarazo (15). Además, existe preocupación sobre la posibilidad de que este defecto pueda generar mutaciones genéticas y epigenéticas en la descendencia que repercutan en su salud a largo plazo (16).

Dado el creciente uso de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) y la probabilidad de que, durante la ICSI, los espermatozoides dañados en el ADN puedan utilizarse para lograr

concepciones humanas, comprender la etiología de este daño y tratar de prevenirlo parece fundamental. Actualmente, la evaluación de SDF se considera cada vez más como una prueba eficaz del potencial de fertilidad de los espermatozoides en el asesoramiento de hombres subfértiles (18). La última versión del manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento del semen humano indica que, aunque todavía se discute, la prueba de fragmentación del ADN espermático es uno de los biomarcadores más prometedores en andrología básica y clínica para agregar al análisis del semen con fines de diagnóstico y para comprender mejor la función del sistema reproductor masculino (19).

El ADN espermático puede dañarse en los testículos durante la espermatogénesis o a lo largo del tracto genital masculino y por la acción de una amplia variedad de factores, incluidos los hábitos relacionados con el estilo de vida, las enfermedades, las drogas, el envejecimiento, las infecciones y la exposición a contaminantes. En este capítulo, revisaremos la literatura sobre los factores que inducen SDF y los mecanismos por los cuales estos conducen a la aparición de rupturas en el ADN espermático. En particular, nos centraremos en las tres causas principales que se han propuesto para explicar la génesis de SDF: apoptosis abortiva, inmadurez de la cromatina y estrés oxidativo (**Figura 1**).



**Figura 1:** Resumen de los orígenes de la fragmentación del ADN espermático (SDF). Una amplia variedad de factores, incluidos los hábitos relacionados con el estilo de vida, el varicocele, el envejecimiento, la exposición a contaminantes y las infecciones del tracto genital, pueden provocar la aparición de SDF. Estos factores pueden generar SDF en diferentes etapas de la espermatogénesis ya sea a lo largo del tracto genital masculino o después de la eyaculación desencadenando diferentes mecanismos.

Smoking and alcohol: Cigarillo y alcohol; unhealthy diet: Dieta insana; Varicocele: Varicocele; Aging: envejecimiento; Toxicants: Tóxicos; Radiations: Radiaciones; Genital tract infections: Infecciones del tracto genital; Abortive Apoptosis: Apoptosis abortiva; Defective Maturation: Maduración defectuosa; Oxidative Stress: Estrés Oxidativo; Testis: Testículo; Epididymis: Epidídimo; Ejaculate: Eyaculado; In vitro: in vitro; Sperm DNA Fragmentation: Fragmentación del ADN espermático.

### Factores y condiciones que afectan el ADN espermático

El tabaquismo y el consumo de alcohol son hábitos de riesgo potencial para la salud general del individuo, incluida la salud reproductiva. Diferentes estudios informaron que estos hábitos, especialmente si son concomitantes, impactan negativamente en SDF (20,21).

Entre otros factores del estilo de vida que influyen en los niveles de SDF, la nutrición juega un papel importante. La creciente adopción de dietas poco saludables, opuestas a la dieta mediterránea, también se refleja en la calidad del esperma (22). Se ha observado que complementar la dieta con alimentos ricos en antioxidantes (que contienen vitamina E y ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) no solo mejora los parámetros seminales estándar sino que también reduce los niveles de SDF (23). Una dieta inadecuada sumada a un estilo de vida más sedentario, favorecen

la aparición de condiciones de sobrepeso o incluso obesidad que actualmente afectan a más de dos tercios de la población de países desarrollados y en vías de desarrollo. Claramente, los estudios sobre los efectos de la nutrición y los tipos de alimentos en los niveles de SDF y la calidad del semen son pocos y necesitan confirmación con cohortes más grandes.

Se ha reportado una asociación positiva entre el IMC y la SDF (24-26), lo que podría explicarse considerando el aumento de las concentraciones de ácidos grasos en plasma en personas con sobrepeso. Estos ácidos grasos pueden sufrir oxidación mitocondrial y peroxisomal produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden impactar en los espermatozoides no solo provocando la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, sino también la fragmentación del ADN de cadena simple y doble (27). Sin embargo, un metaanálisis reciente de Sepidarkish y colegas (28) destaca cómo la asociación entre el IMC y la SDF no es un resultado unánime, ya que también hay artículos en los que no se encuentra asociación. Entre las posibles causas de tal discrepancia, se debe considerar la heterogeneidad de los estudios que incluyen diferente población de estudio, diferentes criterios de elegibilidad, varios sistemas de clasificación del IMC y, sobre todo, diferentes métodos para evaluar el SDF. Sin embargo, algunos estudios demostraron que, después de la cirugía bariátrica en pacientes obesos (IMC superior a 30 kg/m<sup>2</sup>), mejoró la integridad de la cromatina espermática (29-31). Un estudio reciente informó que, después de la cirugía, además de una disminución progresiva de SDF, se observó una reducción de la peroxidación de lípidos espermáticos, lo que sugiere que el estrés oxidativo es un factor crítico que vincula la obesidad con la mala calidad del semen (32).

En los pacientes afectados por el síndrome metabólico (SMet), la obesidad se asocia con diabetes, hipertensión y trastornos vasculares. La asociación entre MetS y SDF se ha informado tanto en modelos animales (33) como en humanos (34-37) donde MetS parece tener un papel significativo en el desarrollo de SDF, al menos en individuos con sobrepeso.

La evidencia clínica demuestra también una asociación entre el varicocele clínico y la SDF (38,39). La causa más aceptada de esta asociación es que la hipertermia escrotal, desarrollada a causa del varicocele, conduce a la generación de ROS en los testículos causando SDF y, probablemente, perjudicando su desempeño reproductivo (40).

Además de estas, se han estudiado otras patologías por su impacto en la infertilidad masculina. Muchos estudios informan que los pacientes con cáncer muestran niveles más altos de daño en el ADN espermático (41-48). En particular, el cáncer de testículo, que probablemente interfiere con el equilibrio normal del control apoptótico en los testículos, provoca altos niveles de daño en el ADN del esperma, similares a los observados en pacientes infértiles (49). Además, el tratamiento con quimioterapia y radioterapia altera la espermatogénesis y la calidad del ADN espermático, ya que las células premeióticas que se replican son extremadamente sensibles a los agentes genotóxicos (50), en una medida que depende del tipo y la intensidad de la terapia (51).

El envejecimiento es uno de los factores de mayor riesgo para las enfermedades humanas, incluida la infertilidad. Grandes estudios informaron los efectos negativos del envejecimiento en algunos parámetros de semen convencionales (volumen, conteo y motilidad) y en SDF (52-55). Con el avance de la edad, el estrés oxidativo se acumula; de hecho, en los hombres mayores, las concentraciones de ROS en el semen son más altas (56) y pueden dañar el ADN espermático. Una explicación alternativa del aumento de SDF con el envejecimiento es que la espermatogénesis puede ser menos efectiva en los hombres mayores, lo que resulta en la liberación en la eyaculación del semen con ADN defectuoso (54).

La exposición a altas temperaturas (57) o a químicos como estireno, plomo, cadmio, boro, bisfenol A, ftalatos (58,59), implica un aumento significativo en los niveles de daño en el ADN espermático. Bosco et al. (60) incluso sugiere el nivel de SDF como un indicador de los impactos nocivos de la contaminación del aire en la salud individual y la capacidad reproductiva.

Según algunos estudios (61-63), alrededor del 15 % de las causas de infertilidad masculina se deben a infecciones del tracto genital masculino, a menudo desatendidas por ser asintomáticas o poco sintomáticas, pero que pueden comprometer la espermatogénesis y las funciones espermáticas. En particular, se ha demostrado que las infecciones por *Mycoplasma*, *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis* influyen en la integridad del ADN espermático humano (64,65). A través de un estudio *in vitro*, demostramos recientemente que la co-incubación de espermatozoides con *Escherichia coli* (una de las especies más frecuentes encontradas en el semen humano (66) condujo a una disminución de la motilidad total y progresiva, una reducción en la viabilidad de los espermatozoides, indujo estrés oxidativo mitocondrial, activó la vía apoptótica y



desencadenó SDF (67). Cada vez se acumula más evidencia sobre el papel de la disbiosis en la microbiota del tracto reproductivo en la infertilidad masculina (68), lo que sugiere que este es un aspecto importante a considerar durante la anamnesis de la pareja infértil para mejorar sus posibilidades reproductivas.

Otra recomendación importante es evitar períodos de abstinencia prolongados, ya que están asociados con niveles más altos de daño en el ADN espermático (69,70) e impactan negativamente en los resultados del TAR (71). Es posible que la acumulación de espermatozoides en el epidídimo durante mucho tiempo haga que los espermatozoides sean más susceptibles al estrés oxidativo.

Finalmente, se puede agregar más daño al ADN del esperma al existente durante la manipulación *in vitro* para el procedimiento ART. La exposición de los espermatozoides a temperaturas elevadas, la extracción de plasma seminal, la centrifugación, los procedimientos de congelación y descongelación pueden inducir estrés oxidativo y, en consecuencia, SDF (72-74).

Todos los factores descritos pueden afectar a los espermatozoides en diferentes etapas y principalmente a través de tres mecanismos no excluyentes entre sí: inducir la apoptosis, alterar el proceso de maduración de la cromatina y producir ROS.

Los espermatozoides se desarrollan en los túbulos seminíferos de los testículos a partir de células madre. Durante el tránsito por el epidídimo, los espermatozoides completan la maduración de la cromatina y, tras la eyaculación, experimentan una capacitación que consiste en una serie de modificaciones bioquímicas que conducen a la adquisición de la capacidad de fecundar el ovocito. La rotura del ADN espermático puede ocurrir durante todos estos pasos críticos. Durante la espermatogénesis, la apoptosis de las células germinales testiculares ocurre continuamente para mantener una proporción correcta entre las células germinales y las células de Sertoli y para eliminar los espermatozoides anormales (75) que están marcados con proteínas Fas y posteriormente fagocitados y eliminados por las células de Sertoli (76). Sin embargo, este proceso puede ser defectuoso y dar lugar a la aparición de espermatozoides con claros signos de apoptosis en el eyaculado (77,78), introdujeron el término "apoptosis abortiva" para definir dicho fenómeno que representa una de las principales causas de la génesis de SDF. Hace algunos años, nuestro grupo describió la aparición, particularmente en semen de hombres oligoastenoteratozoospermicos y astenospérmicos, de elementos redondos anucleados, que contenían ADN fragmentado y presentaban una serie de marcadores apoptóticos (Fas, p53, Bcl-X y actividad caspasa) (79,80) que probablemente se derivan de la apoptosis testicular y sugieren un deterioro de la eficiencia de la espermatogénesis (81). La presencia de tales cuerpos apoptóticos en el semen apoya la teoría de la "apoptosis abortiva". Además, mediante una investigación directa de la concomitancia de la fragmentación del ADN y los signos de apoptosis en los espermatozoides humanos, nuestro grupo encontró una fuerte asociación de los dos fenómenos (82). El inicio del programa apoptótico en los testículos puede desencadenarse por estímulos externos o puede deberse a eventos locales como alteraciones del medio hormonal que modula la supervivencia celular (83) o un deterioro del proceso de maduración de la cromatina (82).

La madurez de la cromatina es una característica fundamental del espermatozoide para entregar ADN intacto al ovocito. De hecho, el empaquetamiento anormal de la cromatina está asociado con una baja tasa de fertilización (84) y mala calidad del embrión (85) y fallas en el embarazo (86) en los programas de TRA. Para lograr la maduración completa de la cromatina, se produce una reorganización espectacular en los núcleos de las espermátides, donde la gran mayoría de las histonas somáticas se sustituyen por protaminas, lo que da lugar a una cromatina altamente condensada y empaquetada. Para promover el alivio transitorio del estrés torsional del ADN y así favorecer la sustitución de histonas primero con proteínas de transición y luego con protaminas, las enzimas topoisomerasas llevan a cabo roturas transitorias de doble cadena (87,88). Como las espermátides son haploides, se ha planteado la hipótesis de que se produce un proceso de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) para reparar roturas de doble cadena en las espermátides, que sin embargo puede generar un repertorio de alteraciones de secuencia (89). Si falla la religadura de las muescas del ADN, la rotura del ADN persiste y se encuentra en los espermatozoides eyaculados. Apoyando la teoría de la maduración alterada de la cromatina como una de las causas de la SDF, se encontró una correlación directa entre la SDF y los marcadores de inmadurez de la cromatina (90,91) y una concomitancia de signos de inmadurez de la cromatina y presencia de ADN. Nuestro grupo encontró roturas en un alto porcentaje de espermatozoides (82).

Los espermatozoides con ADN nuclear pobremente protaminado pueden ser enviados a la apoptosis (ver arriba), o sobrevivir pero más susceptibles al ataque oxidativo (90).

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del cuerpo para contrarrestar sus efectos nocivos a través de la neutralización por parte de los antioxidantes. Una vez que llegan al núcleo del espermatozoide, las ROS conducen a la formación de aductos de base oxidados que luego son eliminados por la enzima espermática (8-oxoguanina ADN glicosilasa 1) creando sitios abásicos relativamente inestables, propensos a la fragmentación. El papel del estrés oxidativo en la génesis de SDF se sustenta en estudios que muestran la presencia de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG), un marcador de estrés oxidativo, en aquellos espermatozoides con ADN fragmentado (90,92). En nuestro estudio también se evaluó la concomitancia de signos de estrés oxidativo y roturas de ADN en los espermatozoides (82). Observamos que la aparición de 8-OHdG y malondialdehído, otro sello distintivo del estrés oxidativo, apenas reflejaba la presencia de roturas de ADN en los espermatozoides. Sin embargo, al usar una estrategia para enfocarse en la fracción de esperma viable del eyaculado, la frecuencia de la concomitancia de marcadores de estrés oxidativo y SDF fue mucho mayor, lo que indica fuertemente que el estrés oxidativo puede generar roturas de ADN principalmente en espermatozoides viables (82). En base a estos resultados, postulamos que el ataque oxidativo es el principal mecanismo responsable de la inducción de SDF después de la espermiación y la eyaculación, así como durante la incubación in vitro (93) o la manipulación de los espermatozoides (74,94,95).

Otro mecanismo que parece participar en la generación de daño en el ADN espermático y que recientemente está atrayendo más atención es la metilación del ADN espermático (96). El proceso de metilación, que puede ocurrir tanto durante la espermatogénesis como durante el tránsito en el tracto epididimario, puede comprometer la estabilidad del genoma y, por lo tanto, hacer que el ADN sea más susceptible al daño (97,98). Varios estudios sugieren una correlación entre los defectos de metilación del ADN y la infertilidad masculina (99) y hallazgos recientes informan correlaciones positivas significativas entre hipermetilación (96,100) o hipometilación (101,102) y SDF. Todavía no se sabe si la metilación aberrante del ADN es la causa o el efecto de SDF (100). Algunos autores argumentan que la metilación del ADN es el mediador de ROS en la inducción del deterioro del ADN espermático (103) y que la suplementación con antioxidantes en hombres infértiles puede resultar en mejoras significativas en la metilación del ADN espermático y, en consecuencia, en la integridad del ADN espermático (104). Ciertamente, se necesitan más estudios para aclarar el papel de las modificaciones epigenéticas en la infertilidad masculina, pero este aspecto debe tenerse en cuenta para realizar un diagnóstico cuidadoso del hombre infértil.

### **Posibles intervenciones para reducir SDF**

Los factores inductores de SDF descritos anteriormente y los mecanismos involucrados pueden representar los puntos de partida para definir tratamientos terapéuticos u otras intervenciones para reducir o prevenir SDF. Ciertamente, la introducción de cambios en el estilo de vida y una nutrición especialmente adecuada podría desempeñar un papel en la reducción de SDF, aunque se necesita más investigación para determinar cómo estos cambios pueden traducirse en mejores resultados reproductivos. En la actualidad, la suplementación oral con antioxidantes representa la opción terapéutica más popular basada en las evidencias de una reducción de la incidencia de SDF después del tratamiento con antioxidantes (105-108). Sin embargo, aunque algunos resultados son alentadores, una revisión Cochrane reciente informó que excluyendo los estudios de análisis con alto riesgo de sesgo e incluyendo solo estudios aleatorios y controlados con placebo, no hay evidencia clara de un aumento de nacidos vivos en hombres subfértiles tratados con antioxidantes en comparación con los no tratados o con placebo. grupos debido a una alta heterogeneidad de los estudios (109).

El otro punto en el que se puede considerar una acción para reducir el daño del ADN espermático es atacar la apoptosis de manera específica del tejido, considerando que la muerte celular programada tiene un papel omnipresente. En este escenario, se ha estudiado ampliamente el uso de la hormona estimulante del folículo que tiene efectos antiapoptóticos específicos a nivel testicular (110). Un metanálisis reciente que incluye seis estudios con 383 hombres con infertilidad idiopática tratados con FSH (111) reveló una disminución leve pero significativa de SDF después de tres meses de tratamiento. Sin embargo, en el caso de los tratamientos antioxidantes, la heterogeneidad de los estudios y la falta de criterios de inclusión claros en la mayoría de ellos no permite sacar conclusiones claras. Curiosamente, existe evidencia de que la selección de hombres

infértiles para el tratamiento con FSH sobre la base de los polimorfismos del receptor de FSH puede ser una estrategia prometedora (112).

Cabe mencionar que estudios clínicos recientes evidenciaron que el uso de espermatozoides testiculares para ICSI puede representar una opción para hombres con SDF alta en semen (113). Esta estrategia se basa en procedimientos de recuperación de espermatozoides testiculares y podría proponerse a hombres en los que puede haber un aumento del estrés oxidativo en el tracto genital masculino. Sin embargo, se debe considerar la posible aparición de efectos adversos después de la extracción testicular de esperma y las molestias para los pacientes.

Otras estrategias menos invasivas que se pueden utilizar para seleccionar espermatozoides con menor SDF antes de proceder con ICSI son: el Magnetic Activated Cell Sorting (MACS), basado en la detección de fosfatidilserina (114); el uso de gran aumento para seleccionar los espermatozoides morfológicamente más normales, ya que la presencia de vacuolas en la región nuclear se ha asociado con una alta SDF (inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSI) (115); la inyección intracitoplasmática fisiológica de espermatozoides (PICSI) (116), basado en la unión de los espermatozoides al ácido hialurónico; el uso de dispositivos de microfluidos, que permiten la migración de los espermatozoides a lo largo de los microcanales (117). Sin embargo, los estudios sobre la eficacia de estos procedimientos han generado conflictos resultados y, a menudo, estas técnicas dependen de la disponibilidad de equipos costosos y personal calificado (118).

En conclusión, aunque existe alguna evidencia de tratamientos exitosos para reducir la fragmentación del ADN espermático, sigue siendo una amenaza para la fertilidad masculina y para la salud de la descendencia. Se necesita más investigación para tener un panel claro de todos los mecanismos y vías involucrados en el origen de SDF y así desarrollar agentes terapéuticos más específicos y mejores intervenciones para los pacientes.

## Referencias

1. Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018; 62:2-10.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:37.
3. Zandieh Z, Vatannejad A, Doosti M, Zabihzadeh S, Haddadi M, Bajelan L, Rashidi B, Amanpour S. Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Ir J Med Sci.* 2018;187:657-62.
4. Turner KA, Rambhatla A, Schon S, Agarwal A, Krawetz SA, Dupree JM, Avidor-Reiss T. Male Infertility is a Women's Health Issue-Research and Clinical Evaluation of Male Infertility Is Needed. *Cells.* 2020; 9:990.
5. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012; 27:2908-17.
6. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11:e0165125.
7. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19:80-90.
8. Chen Q, Zhao JY, Xue X, Zhu GX. The association between sperm DNA fragmentation and reproductive outcomes following intrauterine insemination, a meta analysis. *Reprod Toxicol.* 2019;86:50-55.

9. McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2019;112:54-60.e3.
10. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*. 2012;14:24-31
11. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014; 15: 2-14.
12. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod*. 2008; 23:1035-43.
13. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spanò M. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*. 2004;19:1409-17.
14. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:727-33.
15. Ribas-Maynou J, Yeste M, Becerra-Tomás N, Aston KI, James ER, Salas-Huetos A. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2021; 96:1284-1300.
16. Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl Androl Urol*. 2017; 6:S761-S764.
17. Cho CL, Esteves SC, Agarwal A (2016) Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 18:186-193.
18. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021.
19. Anifandis G, Bounartzi T, Messini CI, Dafopoulos K, Sotiriou S, Messinis IE. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290:777-82.
20. Aboulmaouahib S, Madkour A, Kaarouch I, Sefrioui O, Saadani B, Copin H, Benkhalifa M, Louanjli N, Cadi R. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia*. 2018; 50.
21. Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, et al. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod*. 2009;24:1304-12.
22. Salas-Huetos A, Moraleda R, Giardina S, Anton E, Blanco J, Salas-Salvadó J, Bulló M. Effect of nut consumption on semen quality and functionality in healthy men consuming a Western-style diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2018;108:953-62.
23. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*. 2006; 27:450-2.
24. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum

- reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2010 1;93:2222-31.
25. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, Briot P, Berthaut I, Levy V, Cedrin-Durnerin I, Benzacken B, Chavatte-Palmer P, Levy R. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl*. 2013;15:622-5.
  26. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet*. 2009; 26:427-32.
  27. Sepidarkish M, Maleki-Hajiagha A, Maroufizadeh S, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Razavi M. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2020;44:549-58.
  28. Samavat J, Cantini G, Lotti F, Di Franco A, Tamburrino L, Degl'Innocenti S, Maseroli E, Filimberti E, Facchiano E, Lucchese M, Muratori M, Forti G, Baldi E, Maggi M, Luconi M. Massive Weight Loss Obtained by Bariatric Surgery Affects Semen Quality in Morbid Male Obesity: a Preliminary Prospective Double-Armed Study. *Obes Surg*. 2018; 28:69-76.
  29. Carette C, Levy R, Eustache F, Baron G, Coupaye M, Msika S, Barrat C, Cohen R, Catheline JM, Brugnon F, Slim K, Barsamian C, Chevallier JM, Bretault M, Bouillot JL, Antignac JP, Rives-Lange C, Ravaud P, Czernichow S. Changes in total sperm count after gastric bypass and sleeve gastrectomy: the BARIASPERM prospective study. *Surg Obes Relat Dis*. 2019;15:1271-1279.
  30. Wood GJA, Tiseo BC, Paluello DV, de Martin H, Santo MA, Nahas W, Srougi M, Cocuzza M. Bariatric Surgery Impact on Reproductive Hormones, Semen Analysis, and Sperm DNA Fragmentation in Men with Severe Obesity: Prospective Study. *Obes Surg*. 2020; 30:4840-51.
  31. Fariello RM, de Carvalho RC, Spaine DM, Andretta RR, Caetano EM Jr, Sá GPD, Cedenho AP, Fraietta R. Analysis of the Functional Aspects of Sperm and Testicular Oxidative Stress in Individuals Undergoing Metabolic Surgery. *Obes Surg*. 2021;31:2887-95.
  32. Duale N, Steffensen IL, Andersen J, Brevik A, Brunborg G, Lindeman B. Impaired sperm chromatin integrity in obese mice. *Andrology*. 2014; 2:234-43.
  33. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012; 2:253-63.
  34. Leisegang K, Udodong A, Bouic PJ, Henkel RR. Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia*. 2014;46:167-76.
  35. Leisegang K, Bouic PJ, Henkel RR. Metabolic syndrome is associated with increased seminal inflammatory cytokines and reproductive dysfunction in a case-controlled male cohort. *Am J Reprod Immunol*. 2016; 76:155-63.
  36. Le MT, Nguyen DN, Le DD, Tran NQT. Impact of body mass index and metabolic syndrome on sperm DNA fragmentation in males from infertile couples: A cross-sectional study from Vietnam. *Metabol Open*. 2020;7:100054.
  37. Wang YJ, Zhang RQ, Lin YJ, Zhang RG, Zhang WL (2012) Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele

- repair: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 25:307–314
38. Esteves SC, Gosálvez J, López-Fernández C, Núñez-Calonge R, Caballero P, Agarwal A, Fernández J Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *Int Urol Nephrol* 2015; 47:1471–7.
  39. Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab J Urol*. 2017;16:21-34.
  40. Kumar K, Lewis S, Vinci S, Riera-Escamilla A, Fino MG, Tamburrino L, Muratori M, Larsen P, Krausz C. Evaluation of sperm DNA quality in men presenting with testicular cancer and lymphoma using alkaline and neutral Comet assays. *Andrology*. 2018;6:230-5.
  41. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod*. 2008; 23:1044–52.
  42. O'Donovan M. An evaluation of chromatin condensation and DNA integrity in the spermatozoa of men with cancer before and after therapy. *Andrologia*. 2005; 37:83–90.
  43. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Fernandez JL. The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2008;90:225–7.
  44. Ståhl O, Eberhard J, Cavallin-Ståhl E, Jepson K, Friberg B, Tingsmark C, et al. Sperm DNA integrity in cancer patients: the effect of disease and treatment. *Int J Androl*. 2009; 32:695–703.
  45. Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saias-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, Barthélémy C, Daudin M, Szerman E, Bresson JL, Brugnon F, Bujan L. The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl*. 2012;33:1394-401.
  46. Bujan L, Walschaerts M, Brugnon F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N, Hennebicq S. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril*. 2014;102:667–74.
  47. Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnon F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, Rives N. Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril*. 2013;100:673–80.
  48. Paoli D, Pallotti F, Lenzi A, Lombardo F. Fatherhood and Sperm DNA Damage in Testicular Cancer Patients. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:506.
  49. O'Flaherty C. Iatrogenic genetic damage of spermatozoa. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 791:117-35.
  50. Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Spanò M, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Testicular cancer and sperm DNA damage: short- and long-term effects of antineoplastic treatment. *Andrology*. 2015; 3:122-8.
  51. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm

- concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia*. 2007; 39:45-50.
52. Salmon-Divon M, Shrem G, Balayla J, Nehushtan T, Volodarsky-Perel A, Steiner N, Son WY, Dahan MH. An age-based sperm nomogram: the McGill reference guide. *Hum Reprod*. 2020; 35:2213-2225.
  53. Vaughan DA, Tirado E, Garcia D, Datta V, Sakkas D. DNA fragmentation of sperm: a radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16 945 semen samples. *Hum Reprod*. 2020; 35:2188-96.
  54. Gao J, Yuan R, Yang S, Wang Y, Huang Y, Yan L, Jiang H, Qiao J. Age-related changes in human conventional semen parameters and sperm chromatin structure assay-defined sperm DNA/chromatin integrity. *Reprod Biomed Online*. 2021; 42:973-82.
  55. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*. 2008;71:490-4.
  56. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Effects of occupational exposure - is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality? *Syst Biol Reprod Med*. 2014; 60:227-33.
  57. Giwercman A., Spanó M. Sperm Chromatin and Environmental Factors. In: Zini A., Agarwal A. (eds) *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*. Springer, Cham. 2018.
  58. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, Ye X, Hauser R. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol*. 2010;30:532-9.
  59. Bosco L, Notari T, Ruvolo G, Roccheri MC, Martino C, Chiappetta R, Carone D, Lo Bosco G, Carrillo L, Raimondo S, Guglielmino A, Montano L. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;58:243-249.
  60. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 140:3-11.
  61. Fraczek, M., & Kurpysz, M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem. Cytobiol*. 2015; 53: 201-17 .
  62. Boeri L, Pederzoli F, Capogrosso P, Abbate C, Alfano M, Mancini N, Clementi M, Montanari E, Montorsi F, Salonia A. Semen infections in men with primary infertility in the real-life setting. *Fertil Steril*. 2020;113:1174-1182.
  63. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*. *Fertil Steril*. 2008;90:328-34.
  64. Liu KS, Mao XD, Pan F, An RF. Effect and mechanisms of reproductive tract infection on oxidative stress parameters, sperm DNA fragmentation, and semen quality in infertile males. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021;19:97.
  65. Farsimadan M, Motamedifar M. Bacterial infection of the male reproductive system causing infertility. *J Reprod Immunol*. 2020;

142:103183.

66. Marchiani S, Baccani I, Tamburrino L, Mattiuz G, Nicolò S, Bonaiuto C, Panico C, Vignozzi L, Antonelli A, Rossolini G, Torcia M, Baldi E. Effects of common gram-negative pathogens causing male genitourinary-tract infections on human sperm functions. *Sci Rep* 2021, In press
67. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Male Infertility. *High Throughput*. 2020; 9:10.
68. Gosálvez J, González-Martínez M, López-Fernández C, Fernández JL, Sánchez-Martín P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril*. 2011;96:1083-6.
69. Comar VA, Petersen CG, Mauri AL, Mattila M, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Nicoletti A, Dieamant F, Oliveira JBA, Baruffi RLR, Franco JG Jr. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assist Reprod*. 2017; 21:306-312.
70. Borges E Jr, Braga DPAF, Zanetti BF, Iaconelli A Jr, Setti AS. Revisiting the impact of ejaculatory abstinence on semen quality and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Andrology*. 2019;7:213-219.
71. Marchiani S, Tamburrino L, Ricci B, Nosi D, Cambi M, Piomboni P, Belmonte G, Forti G, Muratori M, Baldi E. SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage. *Reproduction*. 2014;148:453-67.
72. Muratori M, Tarozzi N, Carpentiero F, Danti S, Perrone FM, Cambi M, Casini A, Azzari C, Boni L, Maggi M, Borini A, Baldi E. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Sci Rep*. 2019; 9:7492.
73. Baldi E, Tamburrino L, Muratori M, Degl'Innocenti S, Marchiani S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2020; 220:106314.
74. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*. 1999; 4:38-47.
75. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L (1999) Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*. 276:310-316.
76. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7:428-32.
77. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*. 1999; 251:350-5.
78. Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl*. 2004; 25:797-810.
79. Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E, Muratori M. Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:621-31.
80. Lotti F, Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, Corona G, Fino MG, Degl'Innocenti S, Forti G, Maggi M, Baldi E. Semen apoptotic M540 body levels correlate with testis abnormalities: a study in a cohort of infertile subjects. *Hum Reprod*. 2012; 27:3393-402.



81. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 2015; 21:109-22.
82. Correia S, Cardoso HJ, Cavaco JE, Socorro S. Oestrogens as apoptosis regulators in mammalian testis: angels or devils? *Expert Rev Mol Med*. 2015;17:e2.
83. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009; 91:1119-26.
84. Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Fanfani L, Dolce R, Rastrelli G, Maggi M, Pellegrini S, Baldi E. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. *Sci Rep*. 2017; 7:15122.
85. Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, Kaleli S, Guralp O. Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia*. 2015;47:438-47.
86. Mc Pherson SMG and F.J. Longo: Chromatin structure function alterations during mammalian spermatogenesis: Origin and significance of sperm DNA fragmentation 1497 DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993;37:109-28.
87. Marcon L, G. Boissonneault: Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004;70:910-8.
88. Gregoire M-C, Massonneau J, Simard O, Gouraud A, Brazeau M-A, Arguin M, et al. Male-driven de novo mutations in haploid germ cells. *Mol Hum Reprod*. 2013;19:495-9.
89. Sati L, Ovari L, Bennett D, Simon SD, Demir R, Huszar G. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:570-9.
90. De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod*. 2009; 81:517-24.
91. Santiso R, Tamayo M, Gosálvez J, Meseguer M, Garrido N, Fernández JL. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril*. 2010; 93:314-8.
92. Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl*. 2003; 24:253-62.
93. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, Luppino B, Nadalini M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Maggi M, Baldi E, Borini A. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95:e3624.
94. Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L, Rothkirch TB, De Iuliis GN. Potential importance of transition metals in

- the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014;29:2136-47.
95. Zhu W, Jiang L, Pan C, Sun J, Huang X, Ni W. Deoxyribonucleic acid methylation signatures in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation. *Fertil Steril.* 2021; S0015-0282(21)00525-2.
  96. Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell.* 1986;44:535-43.
  97. Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr AR, Deaton A, Andrews R, James KD, Turner DJ, Illingworth R, Bird A. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature.* 2010; 464:1082-6.
  98. Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:689624.
  99. Rajabi H, Mohseni-Kouchesfehani H, Eslami-Arshaghi T, Salehi M. Sperm DNA fragmentation affects epigenetic feature in human male pronucleus. *Andrologia.* 2018; 50(1).
  100. Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, Boyer P, McElreavey K, Benkhalifa M. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology.* 2015;3:235-40.
  101. Olszewska M, Barciszewska MZ, Fraczek M, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, Barciszewski J, Kurpisz M. Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations. *Asian J Androl.* 2017;19:117-24.
  102. Darbandi M, Darbandi S, Agarwal A, Baskaran S, Dutta S, Sengupta P, Khorram Khorshid HR, Esteves S, Gilany K, Hedayati M, Nobakht F, Akhondi MM, Lakpour N, Sadeghi MR. Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36:241-253.
  103. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26:537-44.
  104. Barekat F, Tavalae M, Deemeh MR, Bahreinian M, Azadi L, Abbasi H, et al. A Preliminary Study: N-acetyl-L-cysteine Improves Semen Quality following Varicocelelectomy. *International Journal of Fertility & Sterility* 2016;10:120-6.
  105. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 2005; 26:349-53.
  106. Martinez-Soto JC, Domingo JC, Cardobilla LP, Pellicer A, Landeras J. Effect of dietary DHA supplementation on sperm DNA integrity. *Fertil Steril* 2010;94:S235-6.
  107. Raigani M, Yaghmaei B, Amirjannti N, Lakpour N, Akhondi MM, Zeraati H, et al. The micronutrient supplements, zinc sulphate and folic acid, did not ameliorate sperm functional parameters in oligoasthenoteratozoospermic men. *Andrologia* 2014; Vol. 46, issue 9:956-62.
  108. Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;3:CD007411.

109. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL, Meachem SJ. Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod.* 2008; 23:403-11.
110. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reprod Biomed Online.* 2018;37:315-326.
111. Simoni M, Santi D, Negri L, Hoffmann I, Muratori M, Baldi E, Cambi M, Marcou M, Greither T, Baraldi E, Tagliavini S, Carra D, Lombardo F, Gandini L, Pallotti F, Krausz C, Rastrelli G, Ferlin A, Menegazzo M, Pignatti E, Linari F, Marino M, Benaglia R, Levi-Setti PE, Behre HM. Treatment with human, recombinant FSH improves sperm DNA fragmentation in idiopathic infertile men depending on the FSH receptor polymorphism p.N680S: a pharmacogenetic study. *Hum Reprod.* 2016;31:1960-9.
112. Esteves SC, Roque M, Bradley CK, Garrido N. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2017 ; 108:456-467.e1.
113. Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010;20:320-3.
114. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, et al. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008;17:610-6.
115. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010;93:598-604.
116. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018;33:1388-93. 247.
117. Esteves SC, Agarwal A, Majzoub A. Comparison of strategies to reduce sperm DNA fragmentation in couples undergoing ICSI. *Transl Androl Urol.* 2017b Sep;6(Suppl 4):S570-S573.

*Traducido, revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO. FUNDAMENTOS Y METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA DISPONIBLE PARA EL LABORATORIO DE ANDROLOGÍA

Juliana Cicaré<sup>1</sup>

Conrado Avendaño<sup>2</sup>

María José Munuce<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Medicina Reproductiva, Instituto Gamma, Rosario, Argentina. <sup>2</sup>Director del Departamento de Investigación y Desarrollo Neolife, Cirugía y Medicina Reproductiva de Asunción, Paraguay. <sup>3</sup>Directora de Reprolab Sanatorio Británico de Rosario y del Laboratorio de Andrología del Servicio de Medicina Reproductiva, Instituto Gamma, Rosario, Argentina.

Autor Corresponsal: María José Munuce. Correo electrónico: [mariajosemunuce@gmail.com](mailto:mariajosemunuce@gmail.com)

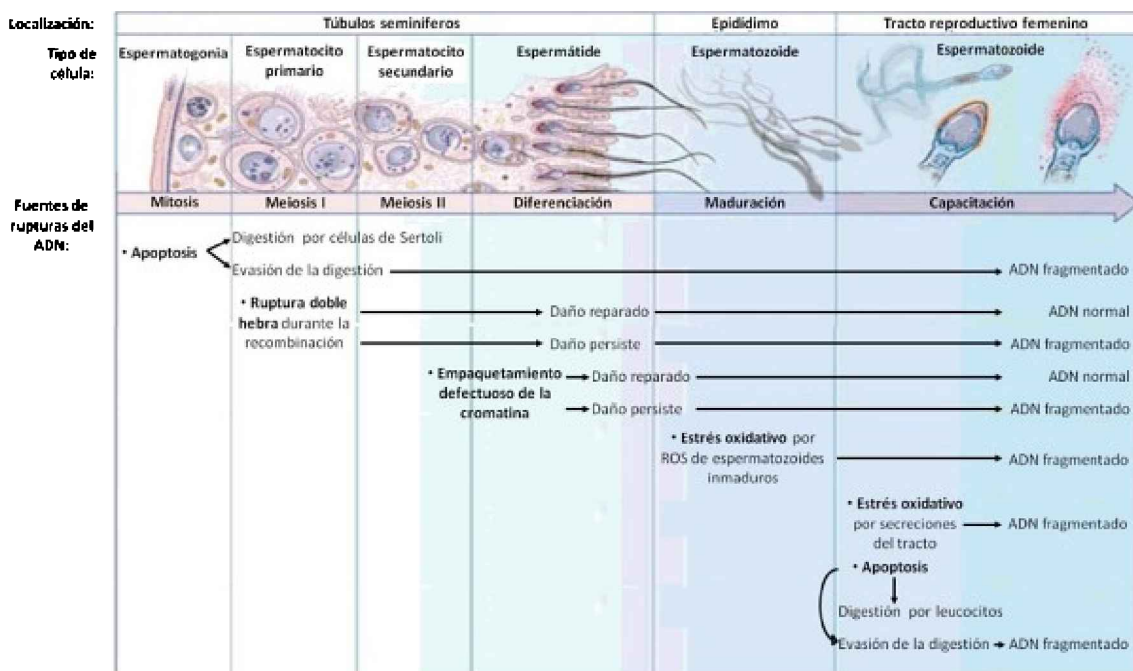
## **El ADN del espermatozoide humano**

El espermatozoide humano posee un ADN eucariótico altamente condensado y organizado de forma específica por lo que difiere sustancialmente del de las células somáticas (1,2). Esta diferencia en la compactación del ADN resulta ser de gran utilidad al reducir el volumen espermático y facilitar su pasaje a través del tracto genital femenino, manteniendo el genoma transcripcionalmente inactivo hasta llegar a su objetivo: el citoplasma ovocitario (3).

La cromatina espermática se encuentra fuertemente empaquetada debido a la presencia de pequeñas proteínas extremadamente básicas denominadas protaminas (4). Durante los últimos pasos de la espermatogénesis, se remodela y condensa el núcleo de la espermátide, con el desplazamiento de las histonas somáticas por histonas específicas del testículo, seguido por proteínas de transición y luego por las protaminas. La maduración de los espermatozoides en el epidídimo comprende la última fase de organización de la cromatina en donde se generan entrecruzamientos (S-S) entre las protaminas que participan en la compactación de la cromatina (5,6).

## **Etiología de la fragmentación del ADN**

El daño al ADN espermático consiste en la fragmentación del mismo por roturas de una o de las dos hebras de ADN. Dentro de las principales causas podemos mencionar (**Figura 1**): [1] la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis, [2] las rupturas en el ADN durante la remodelación de la cromatina en el proceso de espermiogénesis (3) la fragmentación del ADN post-testicular inducida principalmente por especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo los radicales hidroxilo, el óxido nítrico y el anión superóxido (4), el daño inducido por radioterapia y quimioterapia en pacientes oncológicos (6) o por tóxicos ambientales o hábitos nocivos como el tabaquismo (7).



**Figura 1.** Posibles lugares donde se genera la fragmentación del ADN espermático durante el tránsito por el tracto reproductivo masculino y femenino. Adaptado de Sharma y Agarwal, 2011 (2).

Durante la espermatogénesis, un 50% a 60% de todas las células germinales que entran en meiosis I son inducidas a la apoptosis. Estas células son fagocitadas y eliminadas por las células de Sertoli asociadas a ellas (8-10). Sin embargo, este mecanismo no siempre opera de manera eficiente y un porcentaje variable de células germinales defectuosas evaden esta selección y pueden aparecer más tarde en el semen, aún con la apariencia de un espermatozoide normal (11). Durante el tránsito por el oviducto los espermatozoides se capacitan, son seleccionados y atraídos por un gradiente de progesterona liberado por el complejo cúmulo-ovocito (3). Se postula que el oviducto tendría la capacidad de seleccionar el paso de espermatozoides con ADN intacto reteniendo aquellos fragmentados (12).

Para que la fecundación sea exitosa, se requieren niveles controlados de ROS necesarios para que ocurra la capacitación y la hiperactivación espermática. Sin embargo, altos niveles de ROS se asocian a infertilidad masculina ya que se altera la fluidez de la membrana espermática por efecto sobre los ácidos grasos poliinsaturados y las funciones mitocondriales. Esto resulta en una movilidad deteriorada y una disminución de la capacidad fusogénica con el ovocito (13); más aún, dado que las ROS pueden pasar libremente a través de las membranas atacan el ADN espermático generando distinto tipo de daño (doble hebra o simple hebra) según la intensidad del ataque oxidativo (14). Algunos estudios reportaron que los espermatozoides inmaduros producen altos niveles de ROS y pueden inducir daño sobre otros espermatozoides maduros (15). La presencia de leucocitos resulta ser un componente habitual dentro de las células presentes en un eyaculado. Cuando esta cantidad supera el millón/ml estamos en presencia de una leucocitospermia y puede indicar presencia de una infección o inflamación del tracto genital masculino. La activación de los leucocitos genera productos oxidantes altamente tóxicos para el ADN del espermatozoide (16-18). La presencia de espermatozoides inmaduros con exceso de citoplasma residual también se asocia con actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que conduce a la generación excesiva de NADPH y, por lo tanto, a la sobreproducción de ROS (19).

Durante el procesamiento de muestras por Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) puede ocurrir la generación involuntaria de daño iatrogénico (20). Se ha visto que pacientes infértiles son más susceptibles a sufrir daño en el ADN durante el proceso de criopreservación (21). Dentro de las técnicas de selección espermática se sabe que la centrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen altos niveles de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la

inducción de fragmentación del ADN (22). Es por esto que se sugiere la utilización de *swim up* pero sin centrifugación previa (23). La incubación de espermatozoides *in vitro* aún bajo condiciones capacitantes y en presencia de albúmina, puede inducir la generación de ROS con aumento en la lipoperoxidación y daño al ADN debido al propio metabolismo oxidativo del espermatozoide, sin estar asociado a ningún proceso necrótico. Es importante destacar que aun en condiciones de estrés oxidativo inducido (200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (24), los espermatozoides pueden capacitarse (medido a través de la fosforilación en residuos de tirosina) y sufrir la reacción acrosomal inducida por fluido folicular, lo que indicaría que, aún presentando altos niveles de fragmentación del ADN, estos espermatozoides pueden mantener su capacidad fecundante (25). Asimismo, se ha demostrado en modelos animales, que espermatozoides con ADN fragmentado pueden unirse a la *zona pellucida* ovocitaria, penetrarla, decondensarse en el ooplasma y fusionarse con el ADN materno para iniciar los primeros procesos de clivaje embrionario (26-28). Utilizando TRA, se ha observado que varones con alto grado de fragmentación de ADN pueden lograr un embarazo (29), pero con menores chances de sostenerlo debido a la pobre calidad embrionaria (30,32). Si bien, diversos meta-análisis publicados previamente no demostraban relación entre el aumento en la fragmentación del ADN espermático y el embarazo clínico (1, 33-36), recientemente se ha observado que el índice de fragmentación (IF) varía inversamente con la tasa de embarazo clínico, independientemente del TRA utilizado, Fecundación *in vitro* (FIV) o Inyección citoplasmática de espermatozoide (ICSI) (24,37), con un aumento en la tasa de abortos espontáneos (24, 38-40).

### **La necesidad de incluir la integridad del ADN en el estudio de la calidad seminal**

La infertilidad afecta a un 15 - 20% de las parejas y, en aproximadamente la mitad de los casos, es de origen masculino (41). El análisis básico del semen o espermograma, evalúa concentración espermática, pH, volumen, movilidad espermática y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y vivos. Sin embargo, esta metodología no detecta defectos en el espermatozoide a nivel genómico o genético y, además, un alto porcentaje de parejas aún presentando espermogramas considerados normales, no consiguen el embarazo. Esto sugiere la necesidad de afinar las técnicas de evaluación de la calidad seminal ya que el espermograma tradicional resulta insuficiente (42). Por el otro lado, espermatozoides considerados morfológicamente normales por el criterio estricto de evaluación de morfología, pueden presentar su ADN altamente dañado (32-43). Existe evidencia clínica que indica que los espermatozoides de hombres infértiles con parámetros espermáticos normales poseen sustancialmente mayor daño al ADN que los espermatozoides de hombres fértiles (44,45) por lo que se propone a la fragmentación como un buen predictor para diferenciar ambas poblaciones (46). En la reciente 6ta. edición del Manual de la Organización Mundial de la Salud para la evaluación y procesamiento del semen humano (47) se ha incluido al estudio de la fragmentación dentro del ítem de pruebas extendidas, siendo que ediciones anteriores solo se proponía para uso en investigación. Esto demuestra que existe hoy día suficiente evidencia científica y consenso clínico para incluir esta evaluación dentro del estudio completo del varón que presenta no sólo trastornos reproductivos sino también aquel paciente que cursa desórdenes metabólicos, enfermedades urológicas u oncológicas. Se sugiere su evaluación en las siguientes situaciones (48):

- a) fallas repetidas en TRA o mala calidad embrionaria
- b) infertilidad idiopática
- c) alteración severa de los parámetros seminales básicos (concentración, movilidad y morfología)
- d) parejas que han sufrido abortos a repetición
- e) varicocele
- f) enfermedades cónicas
- g) infecciones de las glándulas accesorias
- h) edad paterna avanzada (>45 años)

- i) estilo de vida (tabaquismo, drogas), obesidad,
- j) factores ocupacionales y ambientales
- k) pacientes oncológicos que realizaron tratamientos de quimio o radioterapia.

Con el desarrollo de la FIV y del ICSI se han logrado grandes avances en los TRA. Sin embargo, estas prácticas requieren una selección previa de espermatozoides en las muestras de semen. Este proceso de selección se basa generalmente en la movilidad y morfología del espermatozoide, sin tener en cuenta la integridad del genoma (13,49), lo cual ha hecho que el estudio de la fragmentación tome relevancia principalmente en pacientes que serán tratados con TRA. Existen distintas técnicas de selección de espermatozoides de mejor calidad entre ellas las más difundidas son los gradientes de densidad y el *swim up* (47). Mientras que algunos trabajos proponen que ambas metodología disminuyen el IF (50), otros autores presentan resultados opuestos donde ven aumentado el IF post-tratamiento (51). Nosotros observamos una disminución significativa en los valores medios del IF, utilizando tanto gradientes de densidad como *swim up*. Sin embargo debemos destacar que existe una susceptibilidad individual frente a la técnica de selección por lo cual proponemos realizar el estudio de la fragmentación pre y post-selección en un ciclo previo al TRA para así poder organizar mejor la conducta terapéutica (25).

Se ha propuesto que valores aumentados de fragmentación de ADN disminuyen marcadamente las chances de embarazo, tanto en concepción natural (44,52) como en TRA (53-55). Por lo tanto, la evaluación de la fragmentación del ADN espermático tiene un alto valor predictivo tanto para el resultado de la concepción natural como en TRA. En casos de pacientes con altos niveles de fragmentación y con fallas repetidas en TRA, se han propuesto diferentes estrategias, que aún resultan experimentales, tales como la separación de espermatozoides dañados por columnas de anexina V (MACS) y la recuperación de espermatozoides intactos por nado en placas de microfluidica, entre otras (56). El uso de columnas de anexina V ha sido incluida en la última edición del Manual OMS (47) dentro del capítulo de pruebas de selección debido a su amplia difusión en la clínica (57), si bien se cuestionan aún posibles efectos no deseados durante la exposición al campo magnético por lo que su uso permanece como experimental.

### **Técnicas para evaluar la fragmentación del ADN espermático**

Se ha generado un gran debate respecto del modo en que las distintas técnicas evalúan la fragmentación del ADN, pudiendo ser de manera directa o indirecta. Los **métodos directos**, en donde se marcan directamente las roturas tanto de cadena sencilla como de cadena doble, miden el daño "real" del ADN, mientras los **indirectos** se basan en que las roturas del ADN incrementan la susceptibilidad a la desnaturalización, al iniciarse ésta a partir de los extremos libres. Es debido a esto que los métodos indirectos evalúan la distinta capacidad o predisposición de la cromatina para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Se dice que estas técnicas miden el daño "potencial" del ADN, mientras que los métodos directos miden el daño "real" (58).

#### **Métodos directos**

- Marcado de extremos libres por dUTP (**TUNEL**): Añade nucleótidos marcados con fluorosforo, de manera templado-independiente, en los extremos de las roturas existentes del ADN mediante la reacción catalizada por una transferasa terminal. Puede detectar tanto roturas de doble como de simple cadena. La proporción de ADN dañado puede ser medida tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo (59).
- Ensayo del **COMETA**: Se somete a los espermatozoides (incluidos en un microgel de agarosa) a una solución que remueve puentes disulfuro y proteínas, y posteriormente a una electroforesis. Así el ADN fragmentado, tanto de cadena doble como sencilla, avanza por acción del campo eléctrico generando una imagen similar a la cola de un cometa, mientras que si el ADN está intacto y súper enrollado, no se formara el "cometa" (60). La tinción se realiza con bromuro de etidio, y la evaluación de los cometas puede efectuarse visualmente mediante microscopía de fluorescencia (61) o con ayuda de un programa informático (62,63).

- Ensayo de traducción *in situ* de extremos libres (**ISNT**): Incorpora dUTP (desoxiuridín trifosfato) biotinilado, de manera templado-dependiente, a roturas en el ADN simple hebra con la ADN polimerasa I (64). La exactitud de la ADN polimerasa es elevada, por lo que los dUTP son eficientemente incorporados a los fragmentos de ADN. Así, el ensayo es capaz de identificar varios niveles de daño en el ADN (de pobre a elevado). Sin embargo, al incorporar dUTP de manera templado-dependiente, sólo puede utilizarse para detectar fragmentos de ADN de cadena sencilla, lo que lo vuelve una técnica con menor relevancia biológica (22).

### **Métodos indirectos**

- Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (**SCSA**): Luego de la desnaturalización del ADN con una solución ácida (el ADN fragmentado es más susceptible a ser desnaturalizado), se procede a la tinción con naranja de acridina. El ADN desnaturalizado (fragmentado) se encuentra como simple hebra y posee fluorescencia roja, mientras que el que permanece como doble hebra (ADN intacto) presenta fluorescencia verde (65). La detección se realiza por citometría de flujo que permite medir una gran cantidad de espermatozoides por muestra lo que la hace altamente reproducible (66). Es el único que tiene valores de referencia obtenidos a partir de un meta-análisis en donde se establece que cuando el IF > 30 % se reducen las chances de embarazo in vivo, por Inseminación intrauterina o Fertilización in vitro/ ICSI (67).
- Test de dispersión de la cromatina espermática (**SCD**): consiste en el tratamiento de los espermatozoides con una *solución desnaturalizante* (ácida), la cual produce ADN simple hebra (ADNss) a partir del extremo de un fragmento de ADN roto. Si el ADN no está fragmentado, permanecerá como doble hebra (ADNds) aún después del tratamiento con solución ácida. Luego de una solución de lisis, se evalúa la dispersión del ADN en halos en un gel de agarosa (68,69).

### **Metodologías y su aplicación en el laboratorio clínico**

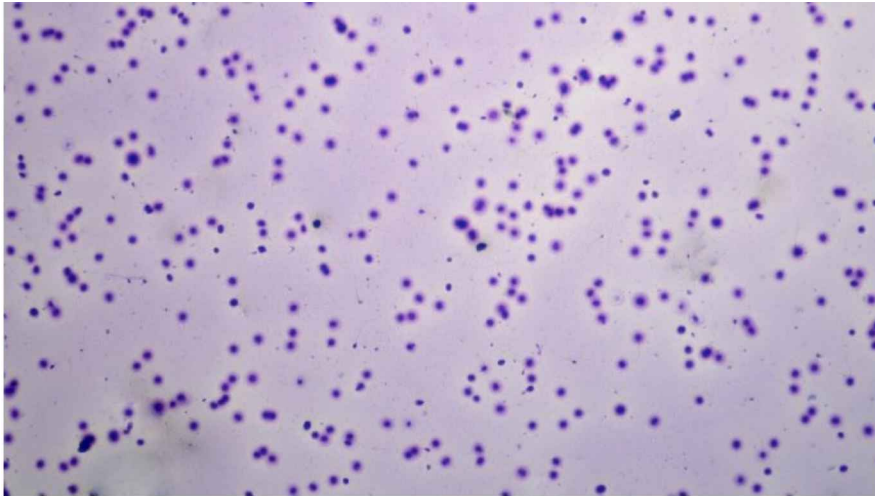
Para que un método pueda ser aplicado en el laboratorio clínico debe cumplir varios requerimientos. Dentro de ellos; debe ser un método accesible (evaluando costo/ beneficio), rápido, reproducible, de fácil aprendizaje y que tenga valores de referencia validados.

Dentro de las metodologías que se han propuesto para la evaluación de la fragmentación del ADN espermático las técnicas del **SCD** y **TUNEL** son las más popularizadas para el diagnóstico clínico, debido a la accesibilidad y/o a la disponibilidad de equipos comerciales para realizar las técnicas, ambas han sido validadas en comparación con otros métodos y resultan tener buena especificidad y sensibilidad para discriminar entre varones fértiles e infértiles (70). Haremos un breve resumen de ambas metodologías:

#### **Test de dispersión de la cromatina espermática (SCD)**

El ADN se encuentra organizado en bucles anclados a la matriz nuclear. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes S-S entre ellas (58). La técnica SCD consiste en el tratamiento de los espermatozoides con una *solución desnaturalizante* (ácida), la cual produce ADN simple hebra (ADNss) a partir del extremo de un fragmento de ADN roto. Si el ADN no está fragmentado, permanecerá como doble hebra (ADNds) aún después del tratamiento con solución ácida. Posteriormente, los espermatozoides son tratados con una *solución de lisis* (con agentes reductores y detergentes) que rompe los enlaces S-S y remueve las proteínas del núcleo permitiendo la descondensación del ADNds y el desenrollamiento de los bucles empaquetados en la matriz nuclear provocando halos de dispersión. Sin embargo, el ADNss interactúa con la cabeza del espermatozoide de manera tal que la remoción de las proteínas nucleares no provoca la dispersión del ADN. De esta manera, luego de la tinción, los espermatozoides con ADN intacto presentan halos de dispersión (patrón “halo grande” y “halo medio”), mientras que aquellos con ADN fragmentado no lo hacen (patrón “halo pequeño”, “sin halo” y “degradado”) (69, 71, 72) (**Figura 2**).





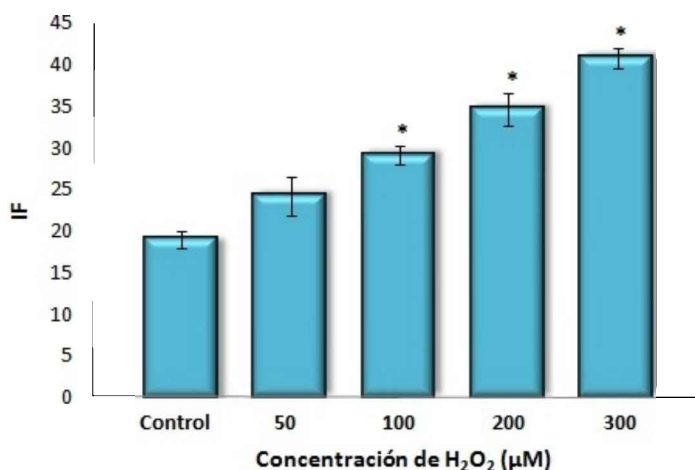
**Figura 2.** Fotomicrografía representativa de la técnica SCD. Obtenidas en microscopio óptico Mikoba con Cámara HD 6.0 a 10x.

#### Ventajas de la técnica:

- No requiere de instrumental costoso más que un baño termostatzado, una estufa de cultivo y un microscopio óptico.
- Es una metodología de fácil implementación por lo que puede solicitarse de rutina junto al espermograma.
- Las placas una vez teñidas pueden guardarse y leerse luego.
- Se pueden guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  las muestras ya sea el semen o suspensión de espermatozoides, permitiendo ahorrar reactivos.
- Existen en el mercado varias marcas comerciales pero también se pueden preparar los reactivos (in home).
- La posibilidad de discriminar el daño extremo (degradados), es una clara e importante ventaja de la técnica SCD, especialmente en pacientes que presentan varicocele.
- Existen programas que permiten automatizar las lecturas de los halos, si bien hoy día aún se encuentra en desarrollo (73).

La técnica SCD ha sido validada de diferentes modos: de manera directa mediante comparación con otras técnicas (ISNT, TUNEL y DBD-FISH) aplicadas al mismo espermatozoide (*in situ*) (71), de manera indirecta mediante comparación con otras técnicas (TUNEL Y SCSA) usando alícuotas de la misma muestra (69-71, 74) y, finalmente, usando agentes que inducen fragmentación del ADN ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , nitroprusiato de sodio o DNasa I) (71).

Nuestro laboratorio ha observado que el tratamiento oxidante ( $>100 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aumenta el índice de fragmentación de forma dosis-dependiente sin afectar la viabilidad ni la motilidad espermática (**Figura 3**) (1). De esta manera, la utilización de un tratamiento oxidante permite introducir un control positivo de fragmentación para la puesta a punto de la técnica.



**Figura 3.** Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el índice de fragmentación del ADN espermático. Realizado con la técnica SCD luego de haber incubado los espermatozoides móviles durante 30 minutos a las distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados se expresan como media ± SEM, \*p < 0.001 respecto del control (1).

- **Preparación de reactivos y materiales**

Preparación de portaobjetos de agarosa 0,65% p/v

- Disolver 0,65 g de agarosa estándar en 100 ml de agua desionizada.
- Calentar hasta ebullición (la agarosa debe estar completamente disuelta).
- Colocar los portaobjetos horizontalmente sobre una superficie que soporte altas temperaturas y cubrirlos con agarosa.

Nota: Previamente identificar el lado del portaobjetos que contiene la agarosa porque, una vez deshidratada, ésta ya no se ve.

- Llevar los portaobjetos a una estufa precalentada a 80°C hasta que la agarosa ya no sea visible.
- Dejar enfriar y guardar en cajas a temperatura ambiente (se puede usar esferas de silica gel para proteger de la humedad).

Nota: La agarosa puede guardarse en un frasco cerrado en heladera y, cuando se desea hacer más portaobjetos, se funde en microondas.

Preparación de eppendorfs de agarosa bajo peso molecular (LMP).

- Disolver 0,1 g de agarosa de bajo punto de fusión en 10 ml de agua destilada (1 % p/v).
- Calentar hasta ebullición (la agarosa debe estar completamente disuelta).
- Distribuir 70 μl en el fondo de tubos eppendorfs de 1 ml.
- Dejar enfriar y almacenar en heladera.

Preparación de la solución de lisis (trabajar preferentemente en cabina extractora o espacio bien ventilado).

Composición: 2,5M NaCl; 0,2M TRIS base; 0,2M DTT; 1% v/v Triton X-100; pH 7,5 ± 0,2.

Para preparar 100 ml de solución de lisis, disolver en agua destilada:

- 14,61 g NaCl
- 2,42 g TRIS base
- 3,085 g ditioneitol (DTT)
- 1 ml Triton X-100 (Nota: añadir en último para evitar hacer espuma)
- Medir pH y ajustarlo a  $7,5 \pm 0,2$  con HCl

Nota: Esta solución puede alicuotarse en tubos y freezarse ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). De esta manera se evita la formación de precipitado (lo que indicaría que debe volver a prepararse).

- **Protocolo SCD**

- Atemperar la solución de lisis
- Fundir un eppendorf con 70  $\mu\text{l}$  de agarosa LMP (baño caliente durante 2 min)
- Atemperar el eppendorf a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 min
- Añadir 30 $\mu\text{l}$  de muestra (ajustar previamente a 5-10 mill de espermatozoides/ml en buffer fosfato (PBS)) en el eppendorf (homogeneizar evitando hacer burbujas). La concentración final de agarosa LMP será de 0,7% p/v.
- Depositar 18-20  $\mu\text{l}$  en el portaobjetos con agarosa y colocar un cubreobjetos de 20 x 20 mm (Nota: si el líquido no se esparce hasta el borde del cubre, presionar gentilmente con el tip).

Nota: Estos últimos 2 pasos se deben realizar rápidamente para que la agarosa no solidifique antes de agregar el cubre.

- Colocar en heladera ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante 8 min.
- Preparar solución ácida 0,08N HCl (Nota: no puede almacenarse, se prepara en el momento), 80  $\mu\text{l}$  HCl puro en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Remover el cubreobjetos: con un portaobjetos empujar desde uno de los bordes del cubre hasta sentir que se libera (Nota: si está muy pegado, esperar a que el portaobjetos tome temperatura ambiente). Luego remover el cubreobjetos suavemente y chequear la presencia de los espermatozoides adheridos al portaobjeto con microscopio a 40x.

A partir de aquí, de ser posible trabajar en cabina extractora, sino ventilar bien.

- Incubar con solución ácida por 8 min: colocar el portaobjetos horizontalmente cubrirlo completamente con la solución. Escurrir el portaobjetos cuidadosamente (Nota: puede utilizarse una hoja de papel tissue para remover el exceso de líquido).
- Incubar con solución de lisis por 25 min. Escurrir el portaobjetos cuidadosamente.
- Incubar con agua destilada por 5 min. Escurrir el portaobjetos cuidadosamente.
- Realizar una deshidratación secuencial, incubando durante 2 min en alcohol 70%, 90% y 100% respectivamente.
- Dejar secar a temperatura ambiente.

Nota: En este punto se pueden guardar en heladera para ser teñido luego.

- Teñir durante 15 min con solución Wright:PBS a partes iguales. Nota: previo a su uso, se debe filtrar con papel filtro y embudo la solución de Wright para evitar la formación de precipitados (esto debe hacerse en fresco cada vez que se tiña). Durante la tinción, se debe mantener en agitación para facilitar su penetración en la agarosa (Nota: puede realizarse soplando con una pera de goma de tesiómetro).
- Aclarar con agua de grifo.
- Teñir por 10 min con solución Wright pura (mantener en agitación).

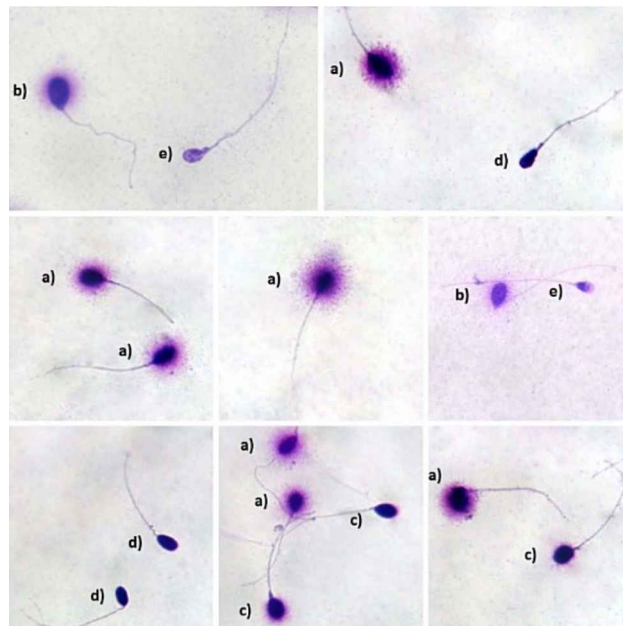
- Aclarar con agua de grifo
- Dejar secar al aire.

Una vez teñidos, los portaobjetos pueden guardarse en heladera o a temperatura ambiente.

Cada laboratorio tiene que ajustar sus tiempos de tinción ya que el poder colorante del Wright decae con el tiempo y la luz lo perjudica. También puede realizarse la tinción en un solo paso de Wright 100 % durante 10 min con agitación.

- **Observación en microscopio de campo claro**

Al menos 400 espermatozoides se analizan en microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión y se clasifican según el diámetro menor del núcleo y el diámetro del halo en los siguientes patrones de fragmentación (**Figura 4**):



**Figura 4.** Fotomicrografías representativas de los espermatozoides correspondientes a los distintos patrones de clasificación observados en la técnica SCD. Obtenidas en microscopio óptico Mikoba con Cámara HD 6.0 a 100x. Se pueden apreciar los distintos patrones de clasificación: a) Halo grande, b) Halo medio, c) Halo pequeño, d) Sin halo y e) Degradado. Las células que no presentan cola (f) no deben ser contadas.

Espermatozoides con ADN no fragmentado

- a) Halo grande: diámetro del halo  $\geq$  diámetro menor del núcleo.
- b) Halo medio:  $1/3$  diámetro menor del núcleo  $<$  diámetro del halo  $<$  diámetro menor del núcleo.

Espermatozoides con ADN fragmentado

- c) Halo pequeño: diámetro del halo  $\leq 1/3$  diámetro menor del núcleo.
- d) Sin halo: solo se observa el núcleo.
- e) Degradados: representan el mayor nivel de degradación de ADN y nuclear y compromete también a la matriz nuclear.

El IF se calcula como: % halo chico + % sin halo + % degradado.

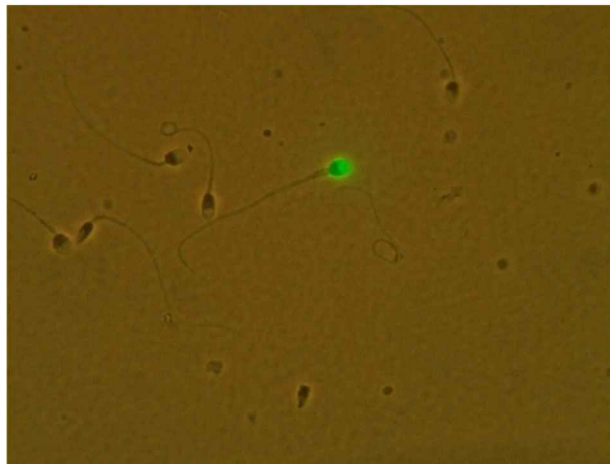
Solo se debe registrar espermatozoides con cola ya que las células de la progenie también generan halos de dispersión. Se analizaron 200 espermatozoides por duplicado a 100x y, para aceptar los replicados, se calcula la máxima diferencia aceptable según el intervalo de confianza centrado en 95% como propone OMS, 2021, para lecturas porcentuales.

Interpretación clínica: Si bien no existen valores de referencia específicos para este test, en líneas generales se utilizan los siguientes valores propuestos por la mayoría de los equipos comerciales: IF <15 % normal, IF: 15 a 29% moderado, IF> 30% severo.

### **Test de TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling)**

El principio está basado en la adición de precursores de ADN marcados (dUTP:desoxyuridena tripfosfato) a las roturas simples o dobles de ADN por medio de una reacción catalizada enzimáticamente usando la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Ésta, incorpora dUTP marcados a los extremos 3'-OH terminales del ADN, que aumenta con el número de roturas (75). Es un ensayo sencillo y no requiere de sofisticación. Ha demostrado tener una baja variabilidad inter e intra observador hace que sea uno de los métodos de elección en la práctica clínica (76). La evaluación se puede realizar tanto por microscopía óptica como por citometría de flujo.

Esta metodología permite determinar la cantidad de espermatozoides con ADN fragmentado (fluorescentes) de los no fragmentados (no fluorescentes) (**Figura 5**). Otra de las grandes ventajas es que se pueden utilizar diferentes tipos de espermatozoides provenientes de testículo, epidídimo, semen o seleccionados por técnicas de selección espermática.



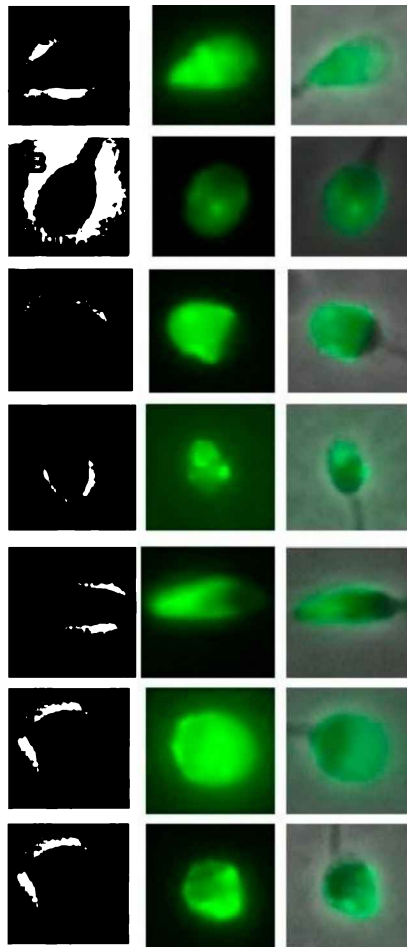
**Figura 5. Técnica de TUNEL.** Observación simultánea en contraste de fase y fluorescencia obtenidas con microscopio de fluorescencia Nikon (Eclipse E600). Se observa un espermatozoide fluorescente (fragmentado) en cada fotomicrografía. Obtenidas en microscopio de epifluorescencia a 100x.

Brevemente, la técnica consta de diferentes pasos: 1) fijación celular, 2) permeabilización, 3) incubación con los dUTP marcados y la enzima 4) observación microscópica o por citometría de flujo. El uso de diferentes concentraciones del fijador o tiempos de incubación (77) así como el empleo de distintos fluoróforos unidos a los dUTPs, pueden afectar los resultados (78). Por lo cual la técnica requiere de una minuciosa estandarización del protocolo a emplear.

Un beneficio que tiene la técnica de TUNEL evaluada por microscopía es que permite la evaluación simultánea de la morfología de los espermatozoides, lo cual puede ayudar a predecir el éxito del embarazo (32, 43, 79). Si bien hemos observado una asociación entre la presencia de fragmentación del ADN y las alteraciones morfológicas (principalmente con formas anómalas o vacuolados), no podemos descartar que algunos espermatozoides morfológicamente normales se encuentren fragmentados (32), (43). La evaluación del TUNEL utilizando citometría de flujo permite evaluar una mayor cantidad de espermatozoides, sin embargo los valores que se observan pueden

ser superiores a los reportados por microscopía de fluorescencia (80). Posiblemente esto pueda deberse a que al evaluar mayor cantidad de espermatozoides, se cometen menos errores en el conteo; o al recuento de cabezas solas sin cola, lo cual no tendría sentido clínico.

Esta técnica utiliza control positivo y negativo para asegurar la correcta realización del método. El control positivo, consiste en los mismos espermatozoides evaluados tratados previamente con DNasa I, la que induce roturas del ADN en el 100% de los espermatozoides (Figura 6). Mientras que el control negativo, consiste en los mismos espermatozoides tratados de la misma forma pero la incubación con dUTP marcados no cuenta con la enzima transferasa, en este caso ningún espermatozoide debe resultar marcado (fluorescente). Si en el control positivo, se encuentran espermatozoides no fluorescentes o en el control negativo hay células fluorescentes, el ensayo debe ser descartado y vuelto a realizar.



**Figura 6. Técnica de TUNEL.** Microfotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia Nikon (Eclipse E600), representativa de la evaluación simultánea de morfología (contraste de fase: izquierda), fragmentación de ADN (fluorescencia: centro) y combinación de contraste de fase y fluorescencia (derecha). Diferencias morfológicas espermáticas presentando TUNEL positivo. A: Piriforme; B: Normal; C: Vacuolado; D: Pequeño; E: Elongado; F: Redondo; G: Amorfo. Obtenidas en microscopio de epifluorescencia a 100x.

Ventajas:

- No requiere de instrumental altamente costoso para un laboratorio más que un microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo, estufa de cultivo, etc.
- Es una metodología de fácil implementación y gran reproducibilidad si se respetan los protocolos establecidos.
- Las muestras una vez fijadas, se pueden guardar a 4°C por un período de tiempo no mayor a 7 días para maximizar reactivos.

- Existen en el mercado varias marcas comerciales para la realización del ensayo.
- La posibilidad de diferenciar patrones de fragmentación lo hace una herramienta sumamente importante en el momento de predecir embarazo en técnicas de reproducción asistida (79).

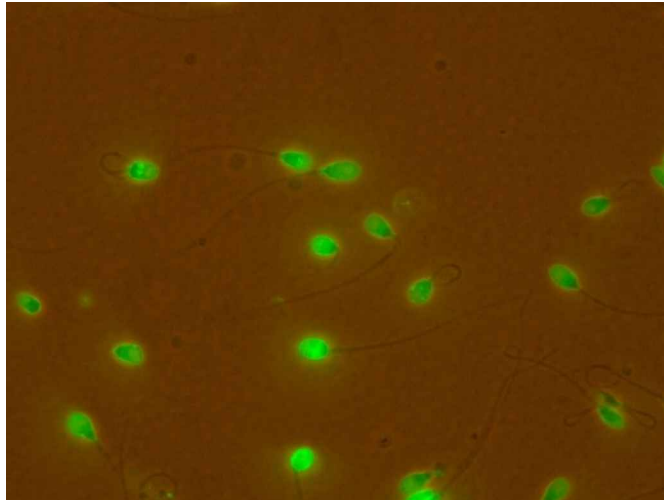
### **Metodología para la realización del Test de TUNEL**

Existen en el mercado kits comerciales para la evaluación de la fragmentación de ADN en células somáticas que han sido adaptados para la evaluación en espermatozoides. Aquí, realizamos un pequeño resumen de los pasos más importantes:

- 1- Tipo de muestra: puede ser semen entero, el cual debe ser lavado con PBS para separar el plasma seminal de las células; espermatozoides seleccionados por el método de selección que utilice la clínica, espermatozoides de testículo y epidídimos que deben ser lavados previamente con PBS.
- 2- Fijación: se puede realizar con paraformaldehído a una concentración final de 2% durante no más de 45 minutos a temperatura ambiente o formaldehído a una concentración final de 2 % durante no más de 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3- Permeabilización: incubación por 10 minutos con Tritoon X-100 al 0,1% diluido en 0,1 % de citrato de sodio concentración final.
- 4- Incubación con el mix de reacción: el mix de reacción conteniendo 0,5 IU/mL de deoxynucleotidil transferasa terminal proveniente de timo de ternero se incubará con los espermatozoides por una hora a 37°C en oscuridad y con 100% de humedad para evitar la evaporación.

Es importante resaltar que en cada uno de los pasos debe ser intensamente lavado para evitar cualquier tipo de interferencia. Las muestras deben ser procesadas en suspensión y no secas en un portaobjeto ya que esto último podría impedir el correcto ingreso de los nucleótidos. Pueden ser incubadas en tubos si se va a realizar por citometría de flujo o en microgotas sobre portaobjetos si se va a realizar por microscopía. Pero nunca esas gotas deben secarse en el transcurrir de la metodología. El secado de las gotas sobre el portaobjetos, puede impedir el ingreso correcto de los nucleótidos.

Espermatozoides fragmentados muestran un claro patrón de intensa fluorescencia en la cabeza de la célula, mientras que los espermatozoides no fragmentados no muestran fluorescencia (**Figura 6 y 7**). Se analizan al menos 200 espermatozoides por duplicado a 100x y, para aceptar los replicados, se calcula la máxima diferencia aceptable según el intervalo de confianza centrado en 95% como propone OMS 2021.



**Figura 7.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio de fluorescencia Nikon (Eclipse E600), representativa de los espermatozoides correspondientes a un control positivo por la técnica de TUNEL. Se observa que el 100% de los espermatozoides presentan fluorescencia. Obtenidas en microscopio de epifluorescencia a 100x.

Interpretación clínica: Los valores de referencia variarán dependiendo del tipo de muestra que se evalúe y los protocolos realizados. Estos valores varían entre 12% a 36%. Cada Laboratorio debe establecer sus propios valores, de acuerdo a los protocolos implementados. En nuestra experiencia consideramos patológicos valores superiores a 12% en muestras que han sido seleccionadas, 20% para el semen entero y 18% de los espermatozoides morfológicamente normales (79, 80).

### Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Sr. Germán Blando de la empresa Microvisión, Rosario por facilitar los equipos para captar las Fotomicrografías del SCD.

### Referencias

1. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(11):e0165125.
2. Sharma RK, Agarwal A. Spermatogenesis: an overview. In: Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction* Humana Press; 2011. p. 19–44.
3. Yanagimachi R. Sperm-egg association in mammals. In: Monroy A, Moscona AA, editors. *Current topics developmental biolog*. 83–105: Academic Press; 1978.
4. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of reproduction*. 1991 Apr;44(4):569-74.
5. Ward WS, Coffey DS. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990 Nov 30;173(1):20-5.
6. Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and clinical andrology*. 2016;26:17.



7. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1027-36.
8. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. 1996 Mar-Apr;2(2):103-17.
9. Pentikainen V, Erkkila K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*. 1999 Feb;276(2 Pt 1):E310-6.
10. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999 Jan;4(1):31-7.
11. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod*. 2004 Oct;19(10):2298-302.
12. Holt WV, Fazeli A. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Molecular reproduction and development*. 2010 Nov;77(11):934-43.
13. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006;175(5):495-500.
14. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development*. 2016;28(1-2):1-
15. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1912-21.
16. Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Human reproduction update*. 1999;5(5):393-8.
17. Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum* infection. *Biology of reproduction*. 2000;63(4):1041-8.
18. Henkel R, Bastiaan HS, Schuller S, Hoppe I, Starker W, Menkveld R. Leucocytes and intrinsic ROS production may be factors compromising sperm chromatin condensation status. *Andrologia*. 2010;42(2):69-75.
19. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *Journal of reproduction and fertility*. 1999;115(1):1-7.
20. Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Longobardi S, Di Rella F, Adiga SK, et al. Sperm Oxidative Stress during In Vitro Manipulation and Its Effects on Sperm Function and Embryo Development. *Antioxidants*. 2021;10(7).
21. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human reproduction*. 2001;16(6):1191-9.
22. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*. 1998;13(7):1864-71.

23. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Molecular human reproduction*. 1998;4(5):439-45.
24. Deng C, Li T, Xie Y, Guo Y, Yang QY, Liang X, et al. Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study. *Andrologia*. 2019;51(6):e13263.
25. Cicare J, Caille A, Zumoffen C, Ghersevich S, Bahamondes L, Munuce MJ. In vitro incubation of human spermatozoa promotes reactive oxygen species generation and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2015;47(8):861-6.
26. Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PloS one*. 2013;8(2):e56385.
27. Ramos-Ibeas P, Calle A, Fernandez-Gonzalez R, Laguna-Barraza R, Pericuesta E, Calero A, et al. Intracytoplasmic sperm injection using DNA-fragmented sperm in mice negatively affects embryo-derived embryonic stem cells, reduces the fertility of male offspring and induces heritable changes in epialleles. *PloS one*. 2014;9(4):e95625.
28. Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of reproduction*. 2008;78(4):761-72.
29. Chi HJ, Kim SG, Kim YY, Park JY, Yoo CS, Park IH, et al. ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2017;44(3):132-40.
30. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology*. 2020;8(1):53-81.
31. Esbert M, Pacheco A, Soares SR, Amoros D, Florensa M, Ballesteros A, et al. High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology*. 2018;6(5):697-706.
32. Avendano C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *Journal of andrology*. 2011;32(4):356-63.
33. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertility and sterility*. 2008;89(4):823-31.
34. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertility and sterility*. 2013;99(3):673-7.
35. Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2006;23(9-10):367-76.
36. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2014;102(4):998-1005 e8.

37. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian journal of andrology*. 2017;19(1):80-90.
38. Borges E, Jr., Zanetti BF, Setti AS, Braga D, Provenza RR, Iaconelli A, Jr. Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertility and sterility*. 2019;112(3):483-90.
39. Haddock L, Gordon S, Lewis SEM, Larsen P, Shehata A, Shehata H. Sperm DNA fragmentation is a novel biomarker for early pregnancy loss. *Reproductive biomedicine online*. 2021;42(1):175-84.
40. Yifu P, Lei Y, Shaoming L, Yujin G, Xingwang Z. Sperm DNA fragmentation index with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*. 2020:101740.
41. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*. 2015;21(4):411-26.
42. Barratt CLR, De Jonge CJ, Sharpe RM. 'Man Up': the importance and strategy for placing male reproductive health centre stage in the political and research agenda. *Human reproduction*. 2018;33(4):541-5.
43. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertility and sterility*. 2009;91(4):1077-84.
44. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction*. 1999;14(4):1039-49.
45. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*. 2002;78(2):313-8.
46. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reproductive biomedicine online*. 2018;37(3):315-26.
47. World Health Organization DoRHaR. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed ed2021.
48. Esteves SC. Interventions to Prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1166:119-48.
49. Sakkas D, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG. Possible consequences of performing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with sperm possessing nuclear DNA damage. *Human fertility*. 2000;3(1):26-30.
50. Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, et al. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(9):1161-6.
51. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, et al. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm

- Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine*. 2016;95(20):e3624.
52. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human reproduction*. 2007;22(1):174-9.
  53. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2015;30(2):120-7.
  54. Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iulii GD, Evenson DP, Henkel R, et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive biomedicine online*. 2013;27(4):325-37.
  55. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertility and sterility*. 2009;92(3):835-48.
  56. Katigbak RD, Turchini GM, de Graaf SP, Kong L, Dumeé LF. Review on Sperm Sorting Technologies and Sperm Properties toward New Separation Methods via the Interface of Biochemistry and Material Science. *Advanced biosystems*. 2019;3(9):e1900079.
  57. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2007;65:515-25.
  58. Cortes-Gutierrez EI, Davila-Rodriguez MI, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Gosalvez J. [Assessing sperm DNA damage]. *Actas urológicas españolas*. 2007;31(2):120-31.
  59. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer research*. 1993;53(8):1945-51.
  60. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular human reproduction*. 1996;2(8):613-9.
  61. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation research*. 1997;375(2):183-93.
  62. Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutation research*. 2012;748(1-2):60-4.
  63. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation research*. 2003;534(1-2):15-20.
  64. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and Sterility*. 2005;84(4):850-3.
  65. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980;210(4474):1131-3.
  66. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23(1):25-43.

67. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive biomedicine online*. 2006;12(4):466-72.
68. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*. 2003;24(1):59-66.
69. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility*. 2005;84(4):833-42.
70. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2019;46(1):14-21.
71. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL. Sperm chromatin dispersion (SCD) test: technical aspects and clinical applications. In: Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction* Humana Press; 2011. p. 151-70.
72. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosálvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods in molecular biology*. 2011;682:291-301.
73. Sadeghi S, Garcia-Molina A, Celma F, Valverde A, Fereidounfar S, Soler C. Morphometric comparison by the ISAS((R)) CASA-DNAf system of two techniques for the evaluation of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Asian journal of andrology*. 2016;18(6):835-9.
74. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology*. 2006;27(1):53-9.
75. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental cell research*. 1993;207(1):202-5.
76. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human reproduction*. 2000;15(6):1338-44.
77. Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, et al. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*. 2010;31(4):336-45.
78. Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Balleca JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry Part A. The journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2007;71(12):1011-8.
79. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility*. 2010;94(2):549-57.
80. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human reproduction*. 2002;17(12):3122-8.

*Revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# IMPACTO DE LAS INFECCIONES EN LA FERTILIDAD MASCULINA

Jesús Ricardo Lozano Hernández<sup>1</sup>

Judith Velasco Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Maimónides. Facultad de Ciencias de la Salud, Buenos Aires-Argentina. Centro de Biomedicina Reproductiva (CEBIOMER), Mérida-Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de síndromes gastrointestinales y urinarios "Profa. Luisa Vizcaya", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Autor correspondiente: Jesús Ricardo Lozano Hernández. Correo electrónico: [jesusricardolozano@gmail.com](mailto:jesusricardolozano@gmail.com)

## Cápsula

Las infecciones transmitidas por las vías sexual y no sexual pueden alterar el tracto genital y la calidad seminal, los agentes causales pueden ser hongos, virus y parásitos.

## Introducción

La infertilidad masculina es un problema de salud de causas múltiples y complejas, donde las infecciones del tracto genitourinario han sido el foco de interés en la medicina reproductiva. Diferentes especies bacterianas detectadas en el semen de hombres infértiles a menudo se adquieren por transmisión sexual mientras que otras adquieren por contaminación, infección sistémica o incremento de la microbiota habitual (Qing *et al.*, 2017; Alekwe *et al.*, 2013).

Las infecciones genitales a menudo son asintomáticas, pasan desapercibidas y tienden a complicarse con el transcurso del tiempo (Villanueva *et al.*, 2003). Estas se inician en la uretra casi siempre y se propagan con el transcurso del tiempo, alcanzan el testículo afectando la espermatogénesis, llegan a las glándulas accesorias y las inflaman o pueden afectar las vías seminíferas causando obstrucción (La Vignera *et al.*, 2011; Abd-Allah *et al.*, 2009).

La prostatitis es la infección glandular más conocida, la cual se caracteriza por descenso de los niveles de ácido cítrico y aumento de la actividad de la elastasa leucocitaria (Zdrodowska *et al.*, 2008). En la prostatitis crónica es frecuente encontrar oligoastenoteratozoospermia (Fu *et al.*, 2014); mientras que en la infección epididimaria hay astenozoospermia con descenso de la  $\alpha$ -glucosidasa neutra (Cooper *et al.*, 1999, 1990). La infección de las vesículas seminales produce a menudo hiperviscosidad del semen, descenso del volumen seminal, con disminución de la fructosa y la movilidad espermática (Lozano, 2018).

Las infecciones uretrales pueden alcanzar una o más de una glándula accesoria, epidídimo y vesículas seminales pueden infectarse unilateral o bilateralmente. En casos de prostatitis (P) y prostato-vesiculitis (PV) es frecuente hallar declive de la calidad espermática (Vicari *et al.*, 2006), y más en los casos de prostato-vesículo-epididimitis (PVE) bilateral (Vignera *et al.*, 2011).

El impacto de las infecciones en el tracto masculino involucra numerosos factores complejos donde participan citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ERO); se altera la función de las glándulas accesorias, aumentan los leucocitos, se inducen respuestas inmunes celulares y humorales y hasta posibles cambios epigenéticos se generan entre otros (Schuppe *et al.*, 2017). La presencia de leucocitos seminales guarda excelente relación con el daño del ADN espermático (Moubasher *et al.*, 2018), en muchas infecciones están por debajo de  $10^6$ /mL (Lozano *et al.*, 2012; WHO, 2010; Gdoura *et al.*, 2007) y no tienen asociación directa con la concentración bacteriana en semen (Rodin *et al.*, 2003). No hay suficientes evidencias para concluir si la combinación de antibióticos y antioxidantes representan el tratamiento ideal para la leucocitospermia, por lo que se necesitan estudios más detallados sobre el valor de corte y sus métodos de medición (Jung *et al.*, 2016).

El tejido infectado se altera por la liberación de radicales libres y citocinas pro-inflamatorias asociadas principalmente a la infiltración de los leucocitos. En un proceso de inflamación/infección del tracto masculino se liberan radicales libres y una amplia variedad de citocinas. Un estudio previo atribuyó importancia a la IL-6 seminal como marcador importante de inflamación del tracto genital (Azenabor *et al.*, 2015). Posteriormente se atribuyó a la IL-8 el papel de marcador predictivo y confiable de prostatitis y leucocitospermia. También en casos de inflamación de epidídimos y vesículas seminales, pero no de testículo (Wahid *et al.*, 2017). Los mecanismos citados ayudan a explicar la viscosidad, las agregaciones, las aglutinaciones, el volumen seminal, la presencia de sangre (hemospermia) y los marcadores de las glándulas accesorias en conjunto (Lozano, 2018). La positividad al cultivo microbiológico de semen demostraría la participación de bacterias y hongos, pero existe la probabilidad de que los cambios seminales sin bacterias pueden deberse a virus o parásitos (Pacheco *et al.*, 2020).

En la primera parte de este capítulo se describen los cambios seminales asociados a las infecciones genitales más comunes. Posteriormente se señalan los cambios seminales que han sido señalados en infecciones seminales causadas por bacterias contaminantes entéricas, por aumento de la microbiota como son las especies de *Staphylococcus coagulans* negativa (SCN) y por infecciones sistémicas causadas por virus, parásitos y hongos.

## Microorganismos comunes e impacto en la calidad seminal

Las tasas de incidencia y prevalencia de las infecciones de transmisión sexual (ITS) son generalmente altas en las poblaciones urbanas y rurales. Las complicaciones en la mujer repercuten negativamente en la fertilidad, en el embarazo poniendo en riesgo la salud y la vida del feto entre otras complicaciones. En hombres infertilidad, estenosis uretrales; artritis secundaria y enfermedad del sistema nervioso central secundaria (Aral *et al.*, 2006). Los cambios seminales ante la presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum* sub sp. *pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, se han descrito como las bacterias más comunes en la infección seminal cuyos aspectos relevantes se destacan a continuación.

### ***Neisseria gonorrhoeae***

Las secuelas a largo plazo de la infección gonocócica no tratada pueden ser graves incluyendo epidídimo-orquitis, síndrome oculo-uretro-sinovial (artritis reactiva), infección gonocócica diseminada e infertilidad (Pogany *et al.*, 2015).

En el tracto urogenital los gonococos liberan factores solubles que interactúan con los espermatozoides, mediante unos *pilis* de diferentes tamaños se adhieren a las colas de los espermatozoides y causan enrollamiento del flagelo con astenozoospermia (Gomez *et al.*, 1979), también descienden la integridad del ADN (Borovkova *et al.*, 2011) y la viabilidad espermática (Puerta y Cardona, 2016).

### ***Treponema pallidum* subsp. *pallidum***

Entre las lesiones de infección treponémica se destacan lesiones genitales y secuelas sistémicas como endarteritis obliterante crónica e inflamación intersticial. Las lesiones gomosas típicas de esta infección se pueden presentar en varios tejidos, incluyendo el testículo (Brookings *et al.*, 2013). Se conoce que en la sífilis congénita se forman testículos fibróticos pequeños (Gimenes *et al.*, 2014). Los primeros estudios de microscopía electrónica realizados en testículos de conejo inoculados con esta bacteria demostraron que colonizaban el espacio intersticial en los fibroblastos y en las células de Leydig; mientras que a nivel del epitelio tubular se observaba en los espermatozoides (Sykes y Miller, 1971). Se conoce que la sífilis genera inflamación y puede causar obstrucción del epidídimo (Fode *et al.*, 2016). La presencia del germen en el semen o líquido prostático es inusual. El semen actúa más como un vector de transmisión que como reservorio. En sujetos infectados con *T. pallidum* subsp. *pallidum* se observa reducción de la concentración y de la movilidad espermática (Godornes *et al.*, 2019), como también del volumen seminal (Adekunle *et al.*, 2011). En la **Tabla 1** se resumen los cambios seminales encontrados en infecciones seminales por *N. gonorrhoeae* y *T. pallidum* subsp. *pallidum*.

**Tabla 1.** Cambios seminales citados en infecciones seminales por *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. Pocas evidencias.

Microorganismo	↓ Volumen	↓ Movilidad	↓ Concentración	↓ Integridad del ADN	↓ Viabilidad
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	---	Gomez <i>et al.</i> , 1979; Borovkova <i>et al.</i> , 2011	---	Borovkova <i>et al.</i> , 2011	Puerta y Cardona, 2016
<i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	Adekunle <i>et al.</i> , 2011	Godornes <i>et al.</i> , 2019	Godornes <i>et al.</i> , 2019	---	---

### ***Chlamydia trachomatis***

Se ha considerado a *C. trachomatis* el microorganismo más común en ITS, alcanzando hasta en un 38,6% en hombres de parejas infértiles (Vigil *et al.*, 2002). Los anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* isotipo IgA se han asociado con una respuesta inflamatoria del tracto genital masculino (Ochsendorf *et al.*, 1999). La primera respuesta inmune a la infección es local, secretan citocinas y quimiocinas proinflamatorias como el interferón gamma. Las células inmunes también trabajan para iniciar y potenciar la inflamación crónica a través de la producción de ERO y la liberación de moléculas con propiedades degradantes que incluyen defensinas, elastasa, colagenasa, catequinas y lisozima. Esta inflamación a largo plazo puede conducir a la proliferación celular (un posible precursor del cáncer), a la remodelación de los tejidos y a la cicatrización, además de estar relacionada con la aparición de respuestas autoinmunes en individuos genéticamente dispuestos (Redgrove y McLaughlin, 2014).

El síndrome de dolor pélvico crónico es el síndrome de prostatitis más común y constituye el 90-95% de los casos. Los pacientes con síndrome de dolor pélvico crónico no tienen evidencia de infección del tracto urinario, por lo que es una enfermedad común de etiología poco clara. Se han realizado varios estudios que destacan la prevalencia de la infección por *C. trachomatis* en pacientes con prostatitis (Redgrove y McLaughlin, 2014). Títulos altos de anticuerpos séricos en hombres infértiles se relacionan con baja movilidad, baja concentración espermática, teratozoospermia y leucocitospermia (Idahl *et al.*, 2007). Se sugiere que para la detección de Ac en semen se evalúe el isotipo IgA (Lozano *et al.*, 2009).

Los cambios espermáticos asociados a la presencia de *C. trachomatis* son controversiales según lo indican algunos estudios (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Cambios espermáticos asociados a *Chlamydia trachomatis*.

Parámetro seminal	Reducción	Sin cambios



<b>Volumen</b>	Westrom, 1990	Ochsendorf <i>et al.</i> , 1999
<b>Concentración y movilidad espermática</b>	Idahl <i>et al.</i> , 2007 Diquelou <i>et al.</i> , 1989 Wolff <i>et al.</i> , 1991 Witkin <i>et al.</i> , 1995 Cengiz <i>et al.</i> , 1997	Gregoriou <i>et al.</i> , 1989 Egger <i>et al.</i> , 1996 Soffer <i>et al.</i> , 1990
<b>Integridad de membrana</b>	Hosseinzadeh <i>et al.</i> , 2001 Hosseinzadeh <i>et al.</i> , 2003	Ochsendorf <i>et al.</i> , 1999
	<b>Aumento</b>	<b>Sin cambios</b>
<b>Leucocitos</b>	Hosseinzadeh <i>et al.</i> , 2003 Hosseinzadeh <i>et al.</i> , 2004 Kokab <i>et al.</i> , 2010 Lozano <i>et al.</i> , 2012 Solomon y Henkel, 2017	Gdoura <i>et al.</i> 2007 Eggert <i>et al.</i> , 2011

### Micoplasmas

Al mencionar Micoplasmas genitales nos referimos a la familia Mycoplasmataceae, en su mayoría especies colonizantes del tracto genital masculino. Desde el punto de vista filogenético *Ureaplasma* spp. tiene dos especies: *U. parvum* y *U. urealyticum* (Kong *et al.*, 1999), a menudo citados de manera indistinta, pero es *U. urealyticum* el agente etiológico de infertilidad y no *U. parvum* (Huang *et al.*, 2015).

*M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. spermatophilum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* y *U. parvum* han sido estudiadas, pero *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* son las especies que han guardado relación con los cambios espermáticos (López y Guerra, 2008).

### *Mycoplasma hominis*

Fue el primer micoplasma aislado y se ha considerado agente causal de la uretritis no gonocócica (UNG) en hombres (Keane *et al.*, 1997). La presencia de *M. hominis* en muestras seminales se ha asociado con menor concentración espermática, bajas formas normales (Gdoura *et al.*, 2007) y plegamiento de los flagelos (Díaz y Flores, 2013). La adherencia e internalización de *M. hominis* se inicia por unión a los sulfoglicolípidos en la membrana espermática, llegando hasta el espacio citosólico en la cabeza y en la pieza intermedia del espermatozoide. El efecto metabólico tóxico de esta bacteria afecta la funcionalidad espermática (Díaz y Flores, 2013). *M. hominis* se une a un grupo de glucosulfolípidos de membrana que se son proteínas de choque térmico de 70KDa y liberan ERO, los cuales disminuyen la fluidez de la membrana (Rottem y Naot, 1998), reducen la movilidad espermática y generan capacitación espermática prematura (Naaby y Herr, 2010; Potts *et al.*, 2000).

### *Mycoplasma genitalium*

*M. genitalium* puede unirse en la pieza intermedia de los espermatozoides, por lo que podría ser transportado hacia la pareja sexual causando enfermedades genitales y/o infertilidad (Svenstrup *et al.*, 2003). La incubación *in vitro* de esta bacteria con espermatozoides móviles produce aglutinación e inmovilización. La unión de *M. genitalium* en la pieza intermedia de los espermatozoides a través de su ampolla puede formar vesículas en el cuello del espermatozoide (Svenstrup *et al.*, 2003).

### *Ureaplasma urealyticum*

*U. urealyticum* es considerado el responsable en un 25% de la uretritis no gonocócica (UNG) en el hombre y por lo general su infección es asintomática (Shimada *et al.*, 2014; Horner, 2007). El mecanismo de patogenicidad de *U. urealyticum* se desconoce; aunque se ha propuesto que mediante la adhesina-4 *U. urealyticum* se unen a los residuos de ácido siálico de los epitelios y mediante la ureasa genera liberación de amonio (Ma y Xu, 2004) el cual disminuye la actividad ATPasa y la movilidad del espermatozoide (Zhao *et al.*, 2016). La bacteria se une a los sulfogalactosilglicerolípidos (SFGGL) de membrana en la cabeza de los espermatozoides (Wu *et al.*, 2004). Los SFGGL son los lípidos más abundantes de la membrana espermática que se expresan desde la etapa de espermatozito primario y son desulfatados por la enzima arilsulfatasa que es propia del microorganismo (Díaz y Flores, 2013). En hombres infértiles con cultivos positivos para *U. urealyticum* se ha encontrado reducción del zinc prostático (Brunner *et al.*, 1983), aumento de la viscosidad seminal y reacción acrosómica prematura (Lozano *et al.*, 2016).

Si observamos los análisis de semen en base al volumen, concentración, movilidad y leucocitos existe una alta probabilidad de que las infecciones causadas por estos gérmenes pasen desapercibidas. Cuando se comparan los cambios seminales en hombres infértiles con (1) *C. trachomatis* (2) *M. hominis* y *U. urealyticum* y (3) Otras bacterias: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *N. gonorrhoeae* y otras especies de microbiota se perciben diferencias en otras características, dicha comparación se hizo en base a dos estudios (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características seminales y marcadores químicos en hombres infértiles sin infección y positivos para *C. trachomatis*, otros patógenos y dos especies de *Mycoplasma*. Concentración: espermatozoides/eyaculado; Movilidad: móviles progresivos

(%): Leucocitos: millones/mL; AGN: Alfaglicosidasa neutra. Fuente: <sup>a</sup> Lozano *et al.*, 2016. <sup>b</sup> Ostaszewska *et al.*, 2007.

Parámetros	Sin infección	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. hominis</i> <i>U. urealyticum</i>	Otros patógenos
Volumen	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia
Concentración	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia
Formas normales	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia
Movilidad	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia
Leucocitos	No cambia	↑↑↑ <sup>a</sup>	No cambia	No cambia
Fructosa	No cambia	↓↓↓ <sup>a</sup>	↓ <sup>a</sup>	No cambia
Ac. cítrico	No cambia	↓↓ <sup>b</sup>	No cambia	No cambia
AGN	No cambia	↓↓ <sup>a</sup>	↓↓↓ <sup>a</sup>	No cambia
pH	No cambia	↑↑↑ <sup>a</sup>	No cambia	No cambia

### Otras bacterias que afectan la calidad seminal

El semen humano se forma por fluido del testículo, del epidídimo y de las glándulas accesorias que son zonas libres de microorganismos. El producto final pasa por la vía uretral durante la eyaculación donde puede arrastrarse la microbiota uretral (Mandar 2013; Ndovi *et al.*, 2007) por lo que la presencia de estos microorganismos en bajas concentraciones no debe tener relevancia, especialmente si el semen está inalterado. Pero ¿qué pasa si esta microbiota está elevada?

### Microbiota aumentada

La uretra masculina tiene una microbiota variada fundamentalmente integrada por *Corynebacterium* spp., *S. aureus*, SCN, *Streptococcus* spp., *Streptococcus* grupo Viridans, *Streptococcus agalactiae* y *Enterobacter* spp. (Wilson, 2009) entre otras. El incremento de esa microbiota sobre las 1.000 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL en semen se conoce como bacteriospermia, la cual se han asociado con alteraciones en los parámetros seminales (Pergialiotis *et al.*, 2018).

La etiología de la bacteriospermia se atribuye a cambios subyacentes del sistema inmunitario del huésped que cambian la dinámica de la microbiota, por lo general aumentándola. El incremento de esta microbiota se ha asociado con prostatitis (Mandar *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2014).

Sería extraño ver un cultivo seminal con alguna especie de *Corynebacterium*. Diferentes especies de esta se han detectado en altas concentraciones en el semen de hombres infértiles con prostatitis (Mashaly *et al.* 2015) y aunque algunas especies bacterianas tienen la capacidad de producir *biofilm*, no hay evidencias que sustenten que existan alteraciones seminales o que el potencial de fertilidad del espermatozoide se encuentre afectado (Turk *et al.* 2014).

En un segundo grupo de especies tenemos *Staphylococcus aureus*, es más conocido como un patógeno de las infecciones hospitalarias y de la comunidad que por causar lesiones en el tracto genital. Aunque es una bacteria infrecuente en el semen, se ha observado que puede inmovilizar y aglutinar los espermatozoides, reduce la movilidad y las formas normales de los espermatozoides. Su presencia puede ser un factor negativo adicional que empeora la calidad del semen y no se descarta de ser causa de infertilidad masculina (Esmailkhani *et al.*, 2018; Kaur y Prabha, 2012). Algunas especies de SCN evitan la colonización de bacterias nocivas como *S. aureus*. El impacto de *S. epidermidis* en la calidad seminal existe por su capacidad de producir una variedad de factores de adherencia, toxinas, hemolisina, leucocidinas y enterotoxinas, polímeros superficiales protectores, exoenzimas, agentes citolíticos y biopelículas que inhiben los principales mecanismos de defensa del hospedero. Los cambios seminales más relevantes en las infecciones seminales causadas por SCN está el incremento de las células redondas en semen y el aumento de las cabezas espermáticas pequeñas redondeadas (Lozano *et al.* 2018). Otro estudio confirmó que SCN inoculados en los testículos de roedores generaban desprendimiento del epitelio seminífero y en los espermatozoides se observaba compactación de las cabezas, con tamaño pequeño y menor volumen acrosomal, dicha celularidad correspondían a células germinales desprendidas (Lozano *et al.*, 2018).

En las especies de cocos grampositivos se ha observado que *Enterococcus faecalis* reduce la movilidad espermática, probablemente por la liberación de la hemolisina, un conocido factor de virulencia que altera la membrana a nivel de la cabeza, el cuello y la pieza media del espermatozoide (Moretti *et al.* 2009; Mehta *et al.* 2002;). Se considera que las otras especies de cocos grampositivos como los estreptococos no se relacionan con la calidad espermática. Solo los factores solubles liberados por *S. agalactiae* generan peroxidación lipídica en la membrana espermática y reducen la movilidad *in vitro* (Zuleta *et al.*, 2019), pero faltan evidencias que demuestren el efecto negativo de esta variedad de bacterias en el semen.

## Bacilos gram negativos

La presencia de bacterias entéricas en semen puede adquirirse por contaminación o por infección. Independientemente de la orientación sexual de hombre, las relaciones sexuales anales frecuentes sin protección traen como consecuencia UNG donde las bacterias entéricas son causa importante (Coull *et al.*, 2008). *Escherichia coli* se ha asociado con prostatitis y epididimo-orquitis, y puede alterar la movilidad espermática porque se adhiere a la membrana plasmática y lisa la célula (Diemer *et al.*, 1996). *E. coli* genera inversión de la fosfatidilserina en la superficie externa iniciando el mecanismo de apoptosis celular (La Vignera *et al.*, 2012; Prabha *et al.*, 2010). Entre otras, *Pseudomonas aeruginosa*, no fermentadora de la glucosa, se ha asociado con epididimitis y prostatitis (Alam *et al.*, 2015; Lipsky *et al.*, 2010; Pellati *et al.*, 2008) así como otras enterobacterias como *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* han sido citadas en otras alteraciones seminales que se resumen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Relación de bacteriospermia con cambios espermáticos.

Bacteria	Alteración seminal	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aglutinación Teratoastozoospermia	Kaur y Prabha, 2013, 2012; Esmailkhani <i>et al.</i> , 2018
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	Teratozoospermia (cabezas compactadas y bajo volumen acrosomal) Aumento de células redondas	Lozano <i>et al.</i> 2018, 2017
<i>Enterococcus faecalis</i>	Teratoastozoospermia Oligoteratozoospermia Baja integridad de membrana	Mehta <i>et al.</i> , 2002; Alekwe <i>et al.</i> , 2013; Moretti <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Astenozoospermia	Zuleta <i>et al.</i> , 2019
<i>Streptococcus</i> spp. grupo Viridans	Teratozoospermia	Paulson y Leto, 1985
<i>Escherichia coli</i>	Aglutinación espermática Infección de glándulas accesorias	Kaur y Prabha, 2013; Golshani <i>et al.</i> , 2006
<i>Morganella morganii</i>	Oligoteratozoospermia Apoptosis y necrosis espermática	Moretti <i>et al.</i> , 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Astenozoospermia Necrozoospermia Color amarillo del semen	Zuleta <i>et al.</i> , 2019

## Virus en el semen

Los virus de transmisión sexual representan un papel especial en diversas infecciones complicadas, asintomáticas y de difícil tratamiento, también pueden ser almacenados, transportados y transmitidos por contacto sexual a la pareja y a sus descendientes (Zea *et al.*, 2010). Recientemente, los informes que muestran su presencia en semen han llamado la atención de especialistas en enfermedades infecciosas, y en la salud pública debido a que antes se desconocía que se transmitían sexualmente (Feldmann, 2018). Por eso es importante considerar que el semen humano es un medio de diseminación de la infección viral (Richens, 2004).

La presencia de virus en semen puede proceder de una infección sistémica o de transmisión sexual. En esta última el semen humano ofrece condiciones óptimas para la supervivencia de muchos virus (Shim, 2011). Aunque los estudios *in vitro* han ayudado a conocer los mecanismos de transmisión viral local o sistémica viral, el impacto de los virus en los sistemas depende de: i) el contexto tisular que a su vez está influenciado por las barreras físicas tales como las interfaces fluido-tejido (linfa / ganglio linfático, sangre / bazo), ii) las poblaciones celulares locales, iii) la migración celular restringida espacialmente y iv) la interacción célula-célula (Sewald *et al.*, 2016).

Podemos citar la prevalencia de algunos virus que han sido identificados en semen durante la manifestación de cuadros clínicos sistémicos, tenemos virus de papiloma humano 4,5%; citomegalovirus 8,7%; los herpes simple tipos 1 y 2 3,7%; el herpes virus 63,7% y el virus de Epstein Barr 0,4%. (Du Plessis *et al.*, 2014). Pueden existir muchos más virus en semen, pero mencionamos los que han sido asociados con cambios en los parámetros seminales.

**VPH** es la infección sexualmente transmitida más común que existe. En este orden se destaca que la prevalencia de la infección por VPH es de 2-31% en la población masculina general y de 10-35,7% en la infertilidad idiopática. Se han tipificado y

secuenciado más de 150 genotipos en la mujer, de los cuales 12 son de alto riesgo de diferentes neoplasias en la mujer (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (Gheit, 2019; Cid *et al.*, 2012). En el hombre la presencia de VPH se ha asociado con la formación de anticuerpos antiespermáticos y baja movilidad espermática, pero los mecanismos moleculares que subyacen al deterioro de la movilidad necesitan estudios adicionales (Foresta *et al.*, 2015, 2011).

### **Cítomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (EBV) y Herpes virus (HV)**

**CMV** es responsable de infecciones fetales y neonatales importantes como también en el tracto genital. En este último caso la infección es adquirida por la vía sexual (Rodríguez y Santana, 2008), causando cambios seminales como hemospermia, azoospermia, oligozoospermia y disfunción epididimaria (Plessis *et al.*, 2014; Naumenk *et al.*, 2014; Du Kimura *et al.*, 1993). También *in vitro* se ha demostrado que el plasma seminal infectado por CMV produce dos tipos de fibrillas conocidas como SEVI y SEM. La primera es la glicoproteína 1 potenciadora de la infección viral y la segunda es una fibrilla amiloide derivada de las semenogelinas, ambas propician la infección y la proliferación viral. Estas fibrillas favorecen la proliferación del CMV y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1)(Qiyi *et al.*, 2013) y del Ebola (Bart *et al.*, 2018).

El **virus Epstein Barr (VEB)** es bien conocido por el cuadro de mononucleosis infecciosa que se manifiestan por fiebre, garganta irritada, fatiga y adenomegalia. En el semen no tiene asociación con cambios en sus parámetros. No obstante, el plasma seminal favorece su replicación del VEB y su expresión temprana en el cuello uterino y, por lo tanto, podría tener relevancia en la etiología del cáncer en esa zona (Ito *et al.*, 1984).

**Herpes** presente en el semen sustenta la posible vía transmisión sexual. Como se mencionó previamente, cambios en la calidad seminal han sido observados en algunas infecciones virales sistémicas, incluyendo el **virus del herpes (HV)**. Son pocas las evidencias que vinculen la presencia del herpes virus en semen con algún otro trastorno reproductivo (Kaspersen y Hollsberg, 2013); sin embargo, dos isotipos de HV se unen a sitios específicos de los glicosaminoglicanos en la superficie del espermatozoide, sus cápsides estimulan la expresión de syndecan-1 en la región ecuatorial de la cabeza, lo cual sugiere realizar estudios posteriores para demostrar si tienen impacto en este aspecto (Foresta *et al.*, 2011).

### **Virus de hepatitis B y hepatitis C**

Sabemos que las infecciones virales como las hepatitis son potencialmente peligrosas y en su mayoría se transmiten a través de líquidos biológicos (Sewald *et al.*, 2016; Denic *et al.*, 2012). Nos referimos en este caso a los estudios en el virus de la hepatitis B (VHB) y al virus de la hepatitis C (VHC).

**VHB** genera cambios seminales como descenso en la concentración, la movilidad, la morfología y la viabilidad espermática (Zhou *et al.*, 2011; Lorusso *et al.*, 2010). Kang *et al.* (2012) demostraron que la incubación de espermatozoides humanos con la proteína S del VHB aumentaba el estrés oxidativo, había pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, se activaban las caspasas y se fragmentaba el ADN como mecanismo apoptótico. Zhou *et al.* (2011) encontraron resultados muy pobres en los procedimientos de inyección intracitoplasmática del espermatozoide o ICSI (intracytoplasmic sperm injection) y en la embrio-transferencia en sujetos antígeno de superficie positivo HBsAg (+), y obviamente en reproducción asistida representa un riesgo notable para el bebé como para las parejas implicadas.

**VHC** no genera cambios directos en los parámetros seminales, pero al ser comparados con los de hombres infértiles sin infección muestran reducción en la concentración, en la movilidad y en las formas normales, con incremento en la fragmentación de ADN espermático y en la apoptosis. En estos sujetos se han encontrado más anomalías en la cromatina y mayor diploidía espermática. También en el plasma seminal la concentración de especies reactivas de oxígeno es tres veces mayor a la de los hombres sin infección (La Vignera *et al.*, 2012; Durazzo *et al.*, 2006).

**Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)** ha sido muy estudiado desde hace cuatro décadas, especialmente en los mecanismos de transmisión y sus complicaciones atribuidas al desbalance inmunológico. En sujetos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la testosterona sérica se encuentra baja, y en el semen se detecta a menudo leucocitospermia, piospermia, astenozoospermia y teratozoospermia (Dondero *et al.*, 1996). Cuando estos hombres seropositivos son controlados hasta recuperar el aumento de los linfocitos sanguíneos CD4+, en ellos mejora la movilidad espermática y se reducen las anomalías morfológicas. Se piensa que el déficit de testosterona es el principal responsable de la maduración defectuosa espermática durante el tránsito en el epidídimo (Dondero *et al.*, 1996).

**Zika** es un virus que ha llamado la atención en la comunidad médica. Si bien las manifestaciones clínicas de la infección en casos de adultos no son graves ni tiene altas tasas de mortalidad, la infección puede tener un impacto en el desarrollo fetal y conducir a una anomalía severa en el desarrollo neurológico (Noorbakhsh *et al.*, 2019). La probabilidad de que enfermedades virales tan complejas como el Zika (ZIKV) puedan ser asintomáticas en algunos individuos dificulta en dar una cifra precisa de su prevalencia, ni se sabe si la prevalencia varía entre poblaciones (Haby *et al.*, 2018). ZIKV *in vitro* altera los túbulos seminíferos del ratón después del aclaramiento de la viremia, afecta a la barrera hemato-testicular donde la secreción de citocinas se eleva significativamente. ZIKV al igual que otros estudios *in vitro* la presencia de virus intratesticulares como el dengue aumentan la expresión de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), de moléculas de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y de moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1). En estos casos los mediadores inflamatorios derivados de macrófagos infectados con ZIKV conducen a la degradación de la proteína ZO-1 en las uniones estrechas que existen entre las células de Sertoli, se debilitan y aumenta la permeabilidad de la barrera. Aunque se desconoce con precisión los tipos de células que favorecen la infección del ZIKV en los testículos humanos, los estudios *in vitro* han ayudado a interpretar algunos de estos posibles mecanismos (Siemann *et al.*, 2017).

**Paramixovirus** es el microorganismo causante de la parotiditis en la etapa prepuberal. Es conocido por generar orquitis urliana o atrofia testicular, siendo esta última condición factor predisponente de cáncer (Galazka *et al.*, 1999). Durante el cuadro infeccioso local hay edema intersticial, infiltración linfocítica y hialinización de los túbulos seminíferos, pudiendo avanzar hasta fibrosis (Cotran *et al.*, 1974). En adultos o adolescentes durante la etapa post infecciosa se observa detención de la espermatogénesis en el 50% de los casos (Bartak, 1986). Shulman *et al.*, (1992) observaron que se producían anticuerpos antiespermáticos después de la infección, porque había alteraciones en la barrera hematotesticular. La oligoastenospermia y la azoospermia aparecieron después de la recuperación de la infección, no fue notable la reducción del volumen testicular en todos los casos. En casos como estos la opción terapéutica para alcanzar la concepción es la extracción de espermatozoides testiculares con ICSI, en lugar de estimular el restablecimiento de la espermatogénesis que tiende a ser poco exitoso en un testículo fibrótico (Ling *et al.*, 1999).

**COVID-19** es el virus de mayor interés en la actualidad, agente causal de una de las pandemias más complejas en los últimos tiempos. Sus estudios se enfocan fundamentalmente en los órganos respiratorios y digestivos (Abobaker *et al.*, 2020). Se ha encontrado que ACE2 es un receptor para la entrada en las células diana por el SARS-CoV-2, se expresa abundantemente en los testículos, incluidas las células espermatogonias, de Leydig y de Sertoli. Se observó aumento de la hormona luteinizante (LH) con aumento de la relación de testosterona/hormona luteinizante (T/LH) y descenso de la relación FSH/LH. El nivel de proteína C reactiva (PCR) se asoció con la relación T/LH sérica. Esta es la primera evidencia directa sobre la influencia de la condición médica de COVID-19 en las hormonas sexuales masculinas, alertando más atención a la evaluación de la función gonadal entre los pacientes recuperados de la infección por SARS-CoV-2, especialmente en los hombres en edad reproductiva (Ling *et al.*, 2020). Como otras enfermedades febriles se ha demostrado que la fiebre puede disminuir temporalmente la espermatogénesis y queda por dilucidar si COVID-19 sigue este modelo. En virtud de que el 80% o más de los infectados son asintomáticos, las implicaciones reproductivas son difíciles de aclarar (Eisenberg, 2020).

En la **Tabla 5** se muestran los cambios clínicos y las alteraciones seminales más frecuentemente en diferentes enfermedades virales y resume los cambios seminales observados en los casos citados y en otras infecciones virales de transmisión sexual.

**Tabla 5.** Virus, afecciones del tracto genital masculino y cambios seminales. VIH: Virus de inmunodeficiencia humana; VPH: Virus del papiloma humano; ZIKV: virus del Zika; VHB: Virus de hepatitis B; VHC: Virus de hepatitis C; CMV: Citomegalovirus; VHS: Virus herpes simple; Paramixovirus: PMV; \*Evidencias en animales de experimentación.

Virus	Impacto clínico	Alteración seminal	Referencia
VIH	Hipoandrogenemia	Hipospermia Astenozoospermia Teratozoospermia Oligozoospermia Leucocitospermia	Waters <i>et al.</i> , 2007 Garolla <i>et al.</i> , 2013 Du Plessis <i>et al.</i> , 2014
VPH	Verrugas en el pene Balanopostitis Cáncer de pene y anal	Oligozoospermia Astenozoospermia	Ying <i>et al.</i> , 1997 Gómez <i>et al.</i> , 2005 Zea <i>et al.</i> , 2010 Capra <i>et al.</i> , 2019
ZIKV*	Bajovolumen testicular Baja expresión de los genes relacionados con esteroidogénesis testicular	Oligozoospermia	Freour <i>et al.</i> , 2016 Dubaut <i>et al.</i> , 2017 Uraki <i>et al.</i> , 2017
VHB	Se integra al ADN espermático. Infecta la línea germinal Induce aberraciones cromosómicas que conducen a defectos hereditarios	Hipospermia Oligozoospermia Astenozoospermia Azoospermia	Karamolahi <i>et al.</i> , 2019 Zhou <i>et al.</i> , 2011
VEB	Disminuye la respuesta de los Linfocitos T y B	No hay cambios evidentes	Ito <i>et al.</i> , 1984
VHC	Descenso de Inhibina B Descenso de testosterona libre	Oligozoospermia Oligoastenozoospermia	Durazzo <i>et al.</i> , 2006 La Vignera <i>et al.</i> , 2012 Karamolahi <i>et al.</i> , 2019
CMV	Inflamación crónica del tracto urogenital	Hemospermia Azoospermia Oligozoospermia Descenso $\alpha$ -glucosidasa neutra	Koment y Poor, 1983 Kimura <i>et al.</i> , 1993 Du Plessis <i>et al.</i> , 2014 Naumenk <i>et al.</i> , 2014
VHS 1 y 2	Epididimitis Prostatitis	Oligozoospermia Astenozoospermia Descenso $\alpha$ -glucosidasa neutra y ácido cítrico	Du Plessis <i>et al.</i> , 2014

<b>PMV</b>	Cáncer testicular Atrofia testicular Azoospermia Oligoastenozoospermia Anticuerpos anti-espermáticos Baja esteroidogénesis	Cotran <i>et al.</i> , 1974 Dejucq y Jégou, 2001 Berhrman <i>et al.</i> , 2004 Lin <i>et al.</i> , 1999 Galazka <i>et al.</i> , 1999
------------	---	--

### Parásitos en semen

Los parásitos que se han visto involucrados en la falla reproductiva han sido estudiados especialmente en la mujer. Hasta un 35% de afección tubo-ovárica y cambios post-inflamatorios en oviducto y peritoneo circundante son inducidos por enfermedades infecciosas (Tsevat *et al.*, 2017). La salpingitis granulomatosa ha sido asociada con infecciones bacterianas y parasitarias donde la oclusión tubárica es común (Patil, 2009; Abraham *et al.*, 1982). A continuación, se describen las tres parasitosis más comunes y se hace referencia a otras parasitosis que también impactan la calidad del semen.

- 1. Tricomoniasis.** Los efectos de *T. vaginalis* son más conocidos en mujeres por causar inflamación, infección vaginal y parto pre-término en mujeres embarazadas. En los hombres genera uretritis con descenso de la calidad espermática, especialmente reduce la movilidad y las formas normales (Shiadeh *et al.*, 2016; Du Plessis *et al.* 2014).
- 2. Esquistosomiasis.** Otra especie de parásito eventual no menos importante es *Schistosoma haematobium*, que genera hemospermia, apoptosis espermática y reduce el volumen seminal (Blanchard 2004). Aunque pocas evidencias sustentan el efecto de las especies de esquistosoma en el tracto reproductor masculino, se ha demostrado la presencia de sus huevos en semen de un azoospermico (Tayra *et al.*, 2010).
- 3. Toxoplasmosis.** *Toxoplasma gondii* en la mujer se ha asociado con abortos, endometritis y otras alteraciones, mientras que en el hombre con disminución de la concentración y la movilidad espermática (Terpsidis *et al.*, 2009). Durante la fase aguda de la infección en ratones se observó que la concentración, la movilidad espermática y las formas normales se reducían, mientras aumentaban las formas anormales como flagelos doblados, con gota citoplasmática y cabezas amorfas (pérdida de forma de gancho, acéfalos y bicéfalos) (Terpsidis *et al.*, 2009).
- 4. Otras parasitosis** menos frecuentes como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* spp., *Plasmodium* spp. y *Leishmania* spp. han sido asociadas con cambios seminales en humanos y en animales, los cuales se resumen en la **Tabla 6** junto a los cambios asociados a las infecciones por las especies ya descritas.

**Tabla 6.** Parásitos asociados a alteraciones de los parámetros seminales en hombres y en animales. UNG: uretritis no gonocócica. Estudios en <sup>a</sup>ratas, <sup>b</sup>perros y <sup>c</sup>carneros.

Parásito	Impacto clínico	Alteración seminal	Referencia
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Uretritis, prostatitis, epididimitis	Oligoastenozoospermia Teratozoospermia Necrozoospermia Hiperiscosidad seminal Aglutinación	Schwebke y Hook 2003 Shiadeh <i>et al.</i> , 2016
<i>Toxoplasma gondii</i>	Anticuerpos antiespermáticos UNG Hipotiroidismo <sup>a</sup> Descenso de: Testosterona, peso testicular, capacidad antioxidante del semen <sup>a</sup>	Oligoastenozoospermia <sup>a</sup> Astenozoospermia Teratozoospermiapor Flagelos enrollados Con gota citoplasmática. Defectos en cabezas (acéfalos, bicéfalos).	Terpsidis <i>et al.</i> , 2009 Dalimi y Abdoli, 2013 Shiadeh <i>et al.</i> , 2016
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Disminución del libido Degeneración testicular Hipoespermatoogénesis Daños en lámina propia de los túbulos seminíferos <sup>b</sup>	Oligozoospermia Astenozoospermia <sup>b</sup>	Rodriguez <i>et al.</i> , 2014

<b><i>Trypanosoma brucei</i> spp.</b>	Hipopituitarismo Desciende: Diámetro de túbulos seminíferos Grosor de la membrana basal Volumen testicular <sup>c</sup> Deterioro de las células de Leydig	Descenso de: Número de células espermatogénicas Vitalidad espermática <sup>c</sup>	Wada <i>et al.</i> , 2016
<b><i>Plasmodium</i> spp.</b>	Desciende la testosterona Aumenta el cortisol	Oligozoospermia Azoospermia) Necrozoospermia)	Shiadeh <i>et al.</i> , 2016
<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	En hombres: amiloidosis y degeneración testicular Epididimitis Prostatitis	Azoospermia Hemospermia Astenozoospermia Teratozoospermia (cabezas desprendidas)	Shiadeh <i>et al.</i> , 2016
<b><i>Schistosoma haematobium</i></b>	Inflamación en las vesículas seminales y próstata	Hemospermia Hipospermia Necrozoospermia	Corachan <i>et al.</i> , 1994 Blanchard <i>et al.</i> , 2004

#### Hongos en semen

Las infecciones fúngicas de los genitales masculinos más frecuentes son balanitis, pitiriasis versicolor y la tiña genital (Aridogan *et al.*, 2011). La mayoría de las uretritis, las balanopostitis y las prostatitis micóticas se deben principalmente a infecciones por *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. y *Coccidioides* spp. (Araiza *et al.*, 2011; Aridogan *et al.*, 2011; López *et al.*, 2005; Wise *et al.*, 1999).

Se sabe que las enfermedades fúngicas invasivas son más frecuentes en los pacientes críticos e inmunodeficientes (Wise *et al.*, 1999) y se ha incrementado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis en localizaciones no habituales como la próstata y el epidídimo (Weidner *et al.*, 1977; López *et al.*, 2005). Un estudio *in vitro* demostró que en el semen de hombres normozoospermicos con suspensiones de *Candida albicans* mostraba reducción de la movilidad y se formaban aglutinaciones espermáticas (Burrello *et al.*, 2004). *C. albicans* puede alterar los parámetros seminales porque genera disminución en la movilidad espermática y aumenta la fragmentación del ADN (Tian *et al.*, 2007). En otros casos se ha reportado que infecciones por *Cryptococcus neoformans* y *Blastomyces* spp. pueden alcanzar al testículo y la próstata tal como se señala en la **Tabla 7** donde se resumen los hallazgos más importantes de este tipo de infecciones.

**Tabla 7.** Hongos relacionados con afecciones del tracto genital masculino y con la función espermática.

Hongos	Impacto clínico	Alteración seminal	Referencia
<b><i>Candida albicans</i></b>	Balanitis, Balanopostitis Orquitis. Prostatitis	Astenozoospermia Descenso de: Vitalidad Potencial de la membrana mitocondrial Aumenta: Apoptosis espermática Condensación de la cromatina	Tian <i>et al.</i> , 2007 Burrello <i>et al.</i> , 2009 Rennemeier <i>et al.</i> , 2009 Castrillón, 2018
<b><i>Cryptococcus neoformans</i></b>	Prostatitis Criptococosis de pene	Oligozoospermia Astenozoospermia Hipospermia Teratozoospermia	Staib <i>et al.</i> , 1989 James y Lomax, 1991 Calista y Grosso 2008, Mayayo y Fernandez 2014 Siddiqui <i>et al.</i> , 2005

<b><i>Blastomyces</i> spp.</b>	Prostatitis y Epididimitis	En hombres: Hemospermia	Seo <i>et al.</i> , 1997 Thayikkannu <i>et al.</i> , 2015
------------------------------------	-------------------------------	----------------------------	---

## Discusión

Los cambios seminales señalados permiten explicar otras causas de infección genital, los cuales al ser claramente identificadas podrían ser solucionados oportunamente.

A la larga lista de factores etiológicos de la astenozoospermia podemos anexar las infecciones no bacterianas causadas por *T. vaginalis*, *T. gondii*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp., VIH, VHB y VHC.

Entre las causas infecciosas no bacterianas de la hemospermia tenemos a *Leishmania* spp., *S. haematobium*, CMV y otras condiciones de inmunosupresión que predisponen la propagación de la infección hasta las glándulas anexas (Moretti *et al.*, 2009; Blanchard, 2004; Koment y Poor, 1983). La hipospermia es otro cambio seminal frecuente que ha tenido numerosas causas, bien sea no infecciosas (periodos de abstinencia corto, recolección incompleta y otras complicaciones de salud) (Roberts y Jarvi, 2009), como causas infecciosas no bacterianas asociadas a *S. haematobium*, VIH y VHB.

La bacteriospermia sin alteraciones seminales requeriría la repetición de un nuevo estudio con condiciones de asepsia previa. Si se descarta la bacteriospermia en un segundo análisis, pudo haber un cultivo falso positivo por contaminación o colonización (Moretti *et al.*, 2009).

El tratamiento antibacteriano ha permitido normalizar los marcadores de las glándulas accesorias y la calidad espermática en casos de infección seminal. Aunque el plasma seminal no contiene factores absolutamente esenciales para la fecundación, estos influyen negativamente en la fisiología espermática en casos de infección de las glándulas accesorias (Lozano y Vivas, 2011).

La resistencia a los antibióticos se ha vuelto tema de discusión importante en los últimos años, particularmente cuando la causa es incremento de la microbiota residente del tracto genital (Machen *et al.*, 2018). Adicionalmente, en la infección genital los antimicrobianos han tenido limitada eficacia porque se trata de compartimientos anatómicos con barreras que pueden limitar su alcance, por el encapsulamiento de algunas bacterias al glicocálix de la matriz extracelular en las glándulas, o probablemente por los cambios de pH local en las vesículas seminales (alcalino) o en la próstata (ácido) (Lozano y Vivas, 2011).

La infección viral adquirida por la vía sexual es a menudo asintomática y se sugiere evaluar en la anamnesis si el paciente viajó a zonas endémicas (Brooks *et al.*, 2016; Freour *et al.*, 2016). Aunque se han señalado diferentes cambios seminales en las infecciones virales, es recomendable esperar si la espermatogénesis se restablece de manera espontánea espontáneamente antes de elegir algún tratamiento (Carlsen *et al.*, 2003).

Los cuadros febriles son respuestas fisiológicas y conductuales evolucionadas del huésped para eliminar una infección. En lugar de incurrir en los costos de desplegar estas respuestas evolucionadas a las infecciones, el cuerpo opta por tolerar una infección como una alternativa a tratar de controlar o eliminar el patógeno infeccioso (Boots y Bowers, 2004) por lo que la oligozoospermia y la astenozoospermia pueden ser temporales.

Por último, la presencia de levaduras en semen tiende a observarse con mayor frecuencia en hombres inmunocomprometidos con oligozoospermia severa. Debido a que las células germinales maduras tienen un efecto paracrinoinmunomodulador dentro del testículo que producen citocinas protectoras. El descenso de la concentración espermática no sería necesariamente consecuencia de una infección bacteriana o micótica sino más bien una causa (Vivas *et al.*, 2007).

## Conclusión

Es posible reducir el rango de infertilidad idiopática al indagar los agentes infecciosos que incluyan otras bacterias infrecuentes, los hongos, los virus o los parásitos mencionados.

Para ampliar el estudio del hombre infértil es necesaria la combinación eficiente de la información de los parámetros seminales y los atributos de la integridad genómica del espermatozoide. Se necesitan estudios dirigidos a gran escala para estandarizar las variables que determinan los rasgos específicos y los valores de referencia que ayudarían a optimizar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de infecciones genitales.

## Referencias

1. Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS y Al-Bakheet SA. (2009). Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxid Med Cell Longev*,2(2):73–81. doi:10.4161/oxim.2.2.8177
2. Abobaker A y Raba AA. Does COVID-19 affect male fertility?. (2020). *World J Urol*, 1-2. doi:10.1007/s00345-020-03208-w
3. Abraham JL, Spore WW y Benirschke K. Cysticercosis of the fallopian tube: histology and microanalysis. (1982). *Hum Pathol*,13(7):665-670.
4. Adekunle OA, Bisi-Johnson MA, Oluwafemi A y Adejuwon CA. (2011). Lipid levels in men infected with *Treponema pallidum*. *Insight Microbiol*,1(2):31-33. Recuperado de: <https://insightknowledge.org/fulltext/?doi=IMICRO-IK.2011.31.33>
5. Alam S, Quaiser S, Khan R, Sultan A, Meher R y Shahzad HF. (2015). Semen culture in patients with chronic prostatitis syndrome: A valuable diagnostic tool. *Int J Curr Microbiol App Sci*,1:236-242. Recuperado de: <https://www.ijcmas.com/special/1/Alam%20Sarah.%20et%20al.pdf>



6. Alekwe L, Osamudiamen AI y Aberare LO. (2013). Association between bacteriospermia and abnormal semen characteristics. *Pak J Med Health Sci*,7(1):3-6.
7. Araiza J, Montes OG, Ponce ORM y Bonifaz A. (2011). Balanitis y balanopostitis candidósica. Comunicación de 20 casos. *Dermatol Rev Mex*, 55: 342-346.
8. Aral SO, Over M, Manhart L y Holmes K. (2006). Sexually transmitted infections. En: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. Chapter 17. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11734/> Co-published by Oxford University Press, New York.
9. Aridogan IA, Izol V y Ilkit M. (2011). Superficial fungal infections of the male genitalia: a review. *Crit Rev Microbiol*,37: 237-244.
10. Azenabor A, Ekun AO y Akinloye O. (2015). Impact of inflammation on male reproductive tract. *J Reprod Infertil*,16(3):123-129.
11. Bart SM, Cohen C, Dye JM, Shorter J y Bates P. (2018). Enhancement of Ebola virus infection by seminal amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*,115(28):7410-7415. doi:10.1073/pnas.1721646115
12. Bartak V. (1986). Sperm count, morphology and motility after unilateral mumps orchitis. *J Reprod Fert*,32: 491-494; Nickel WR, Plumb RT. Mumps Orchitis. En: Harrison JH, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA, Walsh PC, eds, *Campbells Urology*, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Co.: 977-978.
13. Berhrman RE, Kliegman RM y Jenson HB, editors. *Nelson textbook of pediatric*. 17th edition. Philadelphia: Saunders; 2004.
14. Blanchard T. (2004). Schistosomiasis. *Trav Med Infect Di*, 2:5-11.
15. Boots M y Bowers RG. (2004). The evolution of resistance through costly acquired immunity. *Proc Biol Sci*, 271 (1540): 715-723.
16. Borovkova N, Korrovits P, Ausmees K, Türk S, Jöfers K, Punab M, et al. (2011). Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe*, 17(6):414-418.
17. Brookings C, Goldmeier D y Sadeghi-Nejad H. (2013). Sexually transmitted infections and sexual function in relation to male fertility. *Korean J Urol*,54: 149-156.
18. Brooks RB, Carlos MP, Myers RA, White MG, Bobo-Lenoci T, Aplan D, et al. (2016). Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection – Maryland, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*,65(34):915-916.
19. Brunner H, Weidner W y Schiefer HG. (1983). Quantitative studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* in non-gonococcal urethritis and chronic prostatitis. *Yale J Biol Med*,56(5-6): 545-550.
20. Burrello N, Calogero AE, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R y Vicari E. (2004). Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reprod Biomed Online*,8:569-573.
21. Calista D y Grosso C. (2008). Cutaneous cryptococcosis of the penis. *Dermatol Online J*,14(7): 19.
22. Capra G, Schillaci R, Bosco L, Roccheri MC, Perino A y Ragusa MA. (2019). HPV infection in semen: results from a new molecular approach. *Epidemiol Infect*,147:e177. doi:10.1017/S0950268819000621
23. Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH y Skakkeback NE. (2003). History of febrile illness and variation in semen quality. *Hum Reprod*,18: 2089-2092.
24. Castrillón-Duque EX, Puerta-Suárez J y Cardona M. (2018). Yeast and fertility: Effects of *in vitro* activity of *Candida* spp. on sperm quality. *J Reprod Infertil*,19(1):49-55.
25. Cengiz T, Aydoğanlı L, Baykam M, Mungan NA, Tunçbilek E, Dincer M., et al. (1997). Chlamydial infections and male infertility. *Int Urol Nephrol*,29(6): 687-693.
26. Cid-Arregui A, Gariglio P, Kanda T y Doorbar J. (2012). Oncogenic human papillomaviruses: High-risk human Papillomaviruses: Towards a better understanding of the mechanisms of viral transformation, latency and immune-escape. *Open Virol J*,6:160-162. doi: 10.2174/1874357901206010160. Epub 2012 Dec 28.
27. Cooper TG, Yeung CH y Nashan D. (1990). Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl*,13:297-305.
28. Cooper TG. Epididymis. En: Knobil E, Neill J (eds.), *Encyclopedia of Reproduction Vol. II*. London: Academic Press. 1999. pp. 1 -17.
29. Corachan M, Valls ME, Gascon J, Almeda J y Vilana R. (1994). Hematospermia: a new etiology of clinical interest. *Am J Trop Med Hyg*,50(5):580-584.
30. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. eds. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1974. pp. 1181.

31. Coull N, Mastoroudes H, Popert R y O'Brien TS. (2008). Redefining urological history taking - anal intercourse as the cause of unexplained symptoms in heterosexuals. *Ann R Coll Surg Engl*,90(5):403-405. doi:10.1308/003588408X301000
32. Dalimi A y Abdoli A. (2013). *Toxoplasma gondii* an male reproduction impairment: a new aspect of toxoplasmosis. *Jundishapur J Microbiol*,6: e7184.
33. Dejuçq N y Jégou B. (2001). Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol Mol Biol Rev*,65: 208-231.
34. Denic LM, Ostric I, Pavlovic A y Dimitra KO. (2012). Knowledge and occupational exposure to blood and body fluids among health care workers and medical students. *Acta Chirlugosl*,59:71-75.
35. Díaz-García F y Flores-Medina S. (2013). Relación entre infertilidad masculina e infección genitourinaria por micoplasmas: Una actualización. *Perinatol Reprod Hum*. [revista en la Internet]. 2013 Mar [citado 2020 Mar 27]; 27( 1 ): 21-34. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-53372013000100004&Ing=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000100004&Ing=es)
36. Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rován E y Mayer F. (1996). Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *Int J Androl*,19:271-277.
37. Diquelou JY, Pastorini E, Feneux D y Gicquel JM. (1989). The role of *Chlamydia trachomatis* in producing abnormal movements by spermatozoa. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*,18(5):615-625.
38. Dondero F, Rossi T, D'Offizi G, Mazzilli F, Rosso R, Sarandrea N, et al. (1996). Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. *Hum Reprod*,11:765-768.
39. Du Plessis S, Agarwal A y Sabanegh E. (2014). Male infertility. New York: Springer; pp. 134.
40. Dubaut J, Gurung S, Trammell M, Myers D, Reuter D, Preno A, et al. (2017). Semen parameters during Zika virus infection in the olive baboon (*Papioanubis*). *Fertil Steril*, 108: e52-e53.
41. Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C, Bertagna A, Fagà E, Biroli G, et al. (2006). Alterations of seminal and hormonal parameters: An extrahepatic manifestation of HCV infection?. *World J Gastroenterol*,12:3073-3076.
42. Eggert-Kruse W, Buhlinger-Göppfarth N, Rohr G, Probst S, Aufenanger J, Näher H, et al. (1996). Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in semen and relationship with parameters of male fertility. *Hum Reprod*,11: 1408-1417.
43. Eggert-Kruse W, Weltin M y Strowitzki T. (2011). Are chlamydial lipopolysaccharide-directed antibodies in seminal plasma or serum clinically significant during investigation of male infertility?. *Urology*,77(5):1101-1106.
44. Eisenberg ML. (2020). Coronavirus disease 2019 and men's reproductive health. *Fertil Steril*,113(6):1154. doi:10.1016/j.fertnstert.2020.04.039
45. Esmailkhani A, Akhi MT, Sadeghi J, Niknafs B, Zahedi Bialvaei A, Farzadi L, et al. (2018). Assessing the prevalence of *Staphylococcus aureus* in infertile male patients in Tabriz, northwest Iran. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*,16(7):469-474.
46. Feldmann H. (2018). Virus in semen and the risk of sexual transmission. *N Engl J Med*,378(15):1440-1441. doi:10.1056/NEJMe1803212
47. Fode M, Fusco F, Lipshultz L y Weidner W. (2016). Sexually transmitted disease and male infertility: A systematic review. *Eur Urol Focus*,2(4):383-393.
48. Foresta C, Noventa M, De Toni L, Gizzo S y Garolla A. (2015). HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology*,3(2):163-173.
49. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F y Barzon L. (2011). Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE*,6, e15036.
50. Freour T, Mirallié S, Hubert B, Spingart C, Barrière P, Maquart M, et al. (2016). Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Euro Surveill*,21(23). doi: <http://dx.doi.org/10.2807/15607917.ES.2016.21.23.30254>
51. Fu W, Zhou Z, Liu S, Li Q, Yao J, Li W, et al. (2014). The effect of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/PPS) on semen parameters in human males: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*,9(4):e94991.. doi:10.1371/journal.pone.0094991
52. Galazka AM, Robertson SE y Kraigher A. (1999). Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bull World Health Organ*,77: 3-14.
53. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L y Foresta C. (2013). Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol*,100:20-29.
54. Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, et al. (2007). *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *Infect Dis*,8(7):129.
55. Gheit T. (2019). Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front Oncol*. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00355>

56. Gimenes F, Medina FS, Abreu AL, Irie MM, Esquiçati IB, Malagutti N, et al. (2014). Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One*,9(6):e98862. doi: 10.1371/journal.pone.0098862. eCollection 2014.
57. Godornes C, Ciccarese G, Drago F y Giacani L. (2019). *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* DNA and RNA in semen of a syphilis patient without genital or anal lesions. *Sex Transm Dis*,46(6):e62-e64.
58. Golshani M, Taheri S, Eslami G, SuleimaniRahbar AA, Fallah F y Goudarzi H. (2006). Genital tract infection in asymptomatic infertile men and its effect on semen quality. *Iran J Public Health*,35(3):81-84.
59. Gomez G, Stenback W, James A, Criswell B y Williams R. (1979). Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to human sperm. Microscopical study of effect of trypsin and iron. *Brit Jounl Vener Dis*,55: 245-255.
60. Gómez I, Gómez E, Conde S, Maganto E, Navío S y Allona A. (2005). Infección por Papillomavirus en el hombre. Estado actual. *Actas Urol Esp*,29: 365-372.
61. Gregoriou O, Botsis D, Papadias K, Kassanos D, Liapis A y Zourlas PA. (1989). Culture of seminal fluid in infertile men and relationship to semen evaluation. *Int J Gynaecol Obstet*,28(2):149-153.
62. Haby MM, Pinart M, Elias V y Reveiz L. (2018). Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ*,96(6):402–413D. doi:10.2471/BLT.17.201541
63. Horner P. (2007). Asymptomatic men: should they be tested for urethritis?. *Sex Transm Infect*,83(2):81-84.
64. Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A y Pacey A. (2001). Co-incubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod*,16:293–299.
65. Hosseinzadeh S, Eley A y Pacey A. (2004). Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl*,25(1): 104-109.
66. Hosseinzadeh S, Pacey AA y Eley A. (2003). *Chlamydia trachomatis*-induced death of human spermatozoa is caused primarily by lipopolysaccharide. *J Med Microbiol*, 52 (3):193-200.
67. Huang C, Zhu HL, Xu KR, Wang SY, Fan LQ y Zhu WB. (2015). *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*,3(5):809-816. doi: 10.1111/andr.12078.
68. Idahl A, Abramsson L, KumLin U, Liljeqvist J y Olofsson J. (2007). Male serum *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int J Androl*,30(2):99-107.
69. Ito Y, Tokuda H, Morigaki T, Shimizu K, Kawana T, Sanada S, et al. (1984). Epstein-Barr virus-activating principle in human semen. *Cancer Lett*,23:129-134.
70. James CL y Lomax-Smith JD. (1991). Cryptococcal epididymo-orchitis complicating steroid therapy for relapsing polyorchiditis. *Pathology*,23(3):256-258.
71. Jung JH, Kim MH, Kim J, Baik SK, Koh SB, Park HJ, et al. (2016). Treatment of leukocytospermia in male infertility: A systematic review. *World J Mens Health*,34(3):165–172.
72. Kang X, Xie Q, Zhou X, Li F, Huang J, Liu D, et al. (2012). Effects of hepatitis B virus S protein exposure on sperm membrane integrity and functions. *PLoS ONE*,7(3): e33471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033471>
73. Karamolahi S, Yazdi RS, Zangeneh M, Makiani MJ, Farhoodi B y Gilani MAS. (2019). Impact of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection on sperm parameters of infertile men. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*,17(8):551–556.
74. Kaspersen MD y Höllsberg P. (2013). Seminal shedding of human herpes viruses. *Virology*,10:226. doi:10.1186/1743-422X-10-226
75. Kaur K y Prabha V. (2013). Impairment by sperm agglutinating factor isolated from *Escherichia coli*: receptor specific interactions. *Biomed Res Int*,2013:548497.
76. Kaur S y Prabha V. (2012). Infertility as a consequence of spermagglutinating *Staphylococcus aureus* colonization in genital tract of female mice. *PLoS One*,7(12):e52325. doi:10.1371/journal.pone.0052325
77. Keane FE, Thomas BJ, Whitaker L, Renton A y Taylor-Robinson D. (1997). An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners. *Genitourin Med*,73(5):373-377.
78. Kimura M, Maekura S, Satou T y Hashimoto S. (1993). Cytomegaloviral inclusions detected in the seminal vesicle, ductus deferens and lungs in an autopsy case of lung cancer. *Rinsho Byori*,41:1059-1062.
79. Kokab A, Akhondi MM, Sadeghi MR, Modarresi MH, Aarabi M, Jennings R, et al. (2010). Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl*,31(2):114-120.
80. Koment RW y Poor PM. (1983). Infection by human cytomegalovirus associated with chronic hematospermia. *Urology*,22:617-621.

81. Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W y Gilbert GL. (1999). Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*—support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol*,49, 1879–1889.
82. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R y Calogero AE. (2012). Sperm DNA damage in patients with chronic viral C hepatitis. *Eur J Intern Med*,23:e19-e24.
83. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R y Calogero AE. (2011). Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl*,34(5 Pt 2):e330-347.
84. Lin YM, Hsu CC y Lin JS. (1999). Successful testicular sperm extraction and fertilization in an azoospermic man with postpubertal mumps orchitis. *BJU Int*,83: 526–527.
85. Ling M, Wen X, Danyang L, Lei S, Yanhong M, Yao X, et al. (2020). Effect of SARS-CoV-2 infection upon male gonadal function: A single center-based study. *Med Rxiv*. Recuperado de: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.21.20037267v2.full.pdf>
86. Lipsky BA, Byren I y Hoey CT. (2010). Treatment of bacterial prostatitis. *Clin Infect Dis*,50:1641-1652.
87. Liu B, Song Z, Xu A, Su S, Wang Z y Yin C. (2014). Is abnormal expression of semenogelin I involved with seminal vesiculitis?. *Med Hypotheses*,82:338–340.
88. López-Hurtado M y Guerra-Infante F. (2008). Avances en la interacción entre micoplasmas y espermatozoides de humano. *Bioquímica*,33(3):115-121. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/40426900\\_Avances\\_en\\_la\\_interaccion\\_entre\\_micoplasmas\\_y\\_espermatozoides\\_de\\_humano](https://www.researchgate.net/publication/40426900_Avances_en_la_interaccion_entre_micoplasmas_y_espermatozoides_de_humano)
89. López-Martínez R. (2005). Ecología de los hongos patógenos para el hombre. *Rev Mex Mic*,21:85-92.
90. Lorusso F, Palmisano M, Chironna M, Vacca M, Masciandaro P, Bassi E, et al. (2010). Impact of chronic viral diseases on semen parameters. *Andrologia*,42(2):121-126. doi:10.1111/j.1439-0272.2009.00970.x
91. Lozano J, Vivas G y Muñoz M. (2009). Relationship between *Chlamydia trachomatis* infection and biomarkers of accessory glands in infertile men. Reprinted from: papers Contributed to the 9th International Congress of Andrology. Medimond. International Proceedings. Barcelona (Spain), March 7-10:187-190. Editors Ballescà J.L Lagarda and Oliva Virgil R. ISBN 978-88-7587-530-5
92. Lozano R, Velasco J, Pacheco L, Sayago A y Peña J. (2018). Impacto de *Staphylococcus epidermidis* en el testículo murino. *RSVM*,38(1):10-14.
93. Lozano-Hernández R, Gualdrón J, Nava D y Rojas M. (2016). La hiperviscosidad seminal reduce la integridad acrosómica y la movilidad espermática antes y después de la criopreservación. *Rev Inv Clin*,57(3): 268-280.
94. Lozano-Hernández R, Velasco J y Rodríguez M. (2017). International Impact of *Staphylococcus coagulase negative* and other germs on sperm forms. *IJMRHS*,6: 92-97.
95. Lozano-Hernández R, Vivas-Acevedo Gi y Muñoz M. (2012). Mycoplasmas y anticuerpos anti-*Chlamydia* en semen de hombres infértiles y su relación con la calidad seminal y los marcadores de glándulas sexuales accesorias masculinas. *Rev Inv Clin*,53(2): 138-147. Recuperado de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332012000200003&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332012000200003&lng=es)
96. Lozano-Hernández R. (2018). Male accessory glands and sperm function. *Intech Open*: 101-116. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74321>
97. Lozano-Hernández R y Vivas-Acevedo G. (2011). Impacto del tratamiento con antibiótico sobre la calidad seminal y los marcadores químicos de glándulas accesorias sexuales masculinas en presencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Fac Farm*,53(2):13-21.
98. Ma J y Xu C. (2004). Relationship between mycoplasma infection and germ cell sulfogalactosylglycerolipid. *Zhonghua Nan Ke Xue*,10(3):215-221.
99. Machen GL, Bird ET, Brown ML, Ingalsbe DA, East MM, Reyes M, et al. (2018). Time trends for bacterial species and resistance patterns in semen in patients undergoing evaluation for male infertility. *Proc Bayl Univ Med Cent*,31(2):165-167. doi: 10.1080/08998280.2018.1444298
100. Mandar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E, et al. (2017). Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*,24: 211-216.
101. Mandar R. (2013). Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res*,69:32-41.
102. Mashaly M, Masallat DT, Elkholly AA, Abdel I y Mostafa T. (2015). Seminal *Corynebacterium* strains in infertile men with and without leucocytospermia. *Andrologia*,48:355-359.
103. Mayayo E y Fernández-Silva F. (2014). Fungal prostatitis: anupdate. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*,36:167-176.
104. Mehta RH, Sridhar H, Vijay K y Anand K. (2002). High incidence of oligozoospermia and teratozoospermia in human semen infected with the aerobic bacterium *Streptococcus faecalis*. *Reprod Biomed Online*,5:17-21.

105. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini, et al. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet*,26:47-56.
106. Moubasher A, Sayed H, Mosaad E, Mahmoud A, Farag F y Taha EA. (2018). Impact of leukocytospermia on sperm dynamic motility parameters, DNA and chromosomal integrity. *Cent European J Urol*,71(4): 470–475.
107. Naaby-Hansen S y Herr JC. (2010). Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol*,84(1):32-40. doi:10.1016/j.jri.2009.09.006
108. Naumenk V, Tyulenev Y, Kurilo L, Shileiko L, Sorokina T, Evdokimov V, et al. (2014). Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology*,2: 687-694.
109. Ndovi TT, Parsons T, Choi L, Caffo B, Rohde C y Hendrix CW. (2007). A new method to estimate quantitatively seminal vesicle and prostate gland contributions to ejaculate. *Br J Clin Pharmacol*,63:404-420.
110. Noorbakhsh F, Abdolmohammadi K, Fatahi Y, Dalili H, Rasoolinejad M, Rezaei F, et al. (2019). Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. *Iran J Public Health*,48(1):20-31.
111. Ochsendorf F, Ozdemir K, Rabenau H, Fenner T, Oremek R, Milbradt R, et al. (1999). *Chlamydia trachomatis* and male infertility: chlamydia-IgA antibodies in seminal plasma are *C. trachomatis* specific and associated with an inflammatory response. *J Eur Acad Derm Venereol*,12: 143–152.
112. Pacheco L, Ricardo Lozano-Hernández R y Velasco J. (2020). Revisión de Agentes infecciosos infrecuentes que afectan los parámetros seminales y la fertilidad. *Rev Cub Urol*, Aceptado, en edición.
113. Patil M. (2009). Assessing tubal damage. *J Hum Reprod Sci*,2(1):2-11.
114. Paulson JD y Leto S. (1985). The reproductive effects of microorganisms in semen. In: Keith L.G., Berger G.S. (eds) *Common Infections. Infections in Reproductive Health*, vol 1. Springer, Dordrecht.
115. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. (2008). Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*,140:3-11.
116. Pergialiotis V, Karampetsou N, Perrea DN, Konstantopoulos P y Daskalakis G. (2018). The impact of bacteriospermia on semen parameters: A meta-analysis. *J Family Reprod Health*,12(2):73-83.
117. Pogany L, Romanowski B, Robinson J, Gale-Rowe M, Latham-Carmanico C, Weir C, et al. (2015). Management of gonococcal infection among adults and youth: New key recommendations. *Can Fam Physician*,61(10):869-873, e451-e456.
118. Potts J, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G y Agarwal A. (2000). Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol*,163:1775–1778.
119. Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, Mavuduru RS, et al. (2010). Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. *Adv Urol*,240268, 2010.10
120. Puerta-Suárez J y Cardona-Maya WD. (2016). Evaluación in vitro del efecto de *Neisseria gonorrhoeae* y los factores solubles producto de su metabolismo sobre la calidad espermática. *Rev Chil Obstet Ginecol*. [Internet]. Jun [citado 2020 Mar 25]; 81(3): 211-217. Recuperado de: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75262016000300007&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262016000300007&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262016000300007>.
121. Qing L, Song QX, Feng JL, Li HY, Liu G y Jiang HH. (2017). Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* infections using a novel isothermal simultaneous RNA amplification testing method in infertile males. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*,16(1):45. doi: 10.1186/s12941-017-0220-2.
122. Qiyi T, Roan N y Yasuhiro Y. (2013). Seminal plasma and semen amyloids enhance cytomegalovirus infection in cell culture. *J Virol*,87:12583-12591.
123. Redgrove KA y McLaughlin EA. (2014). The role of the immune response in *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract: A double-edged sword. *Front Immunol*,5:534. doi:10.3389/fimmu.2014.00534
124. Rennemeier C, Frambach T, Hennicke F, Diel J y Staib P. (2009). Microbial quorum-sensing molecules induce acrosome loss and cell death in human spermatozoa. *Infect Immun*,77(11):4990–4997. doi:10.1128/IAI.00586-09
125. Richens J. (2004). Genital manifestations of tropical diseases. *Sex Transm Infect*, 80: 12-17.
126. Roberts M y Jarvi K. (2009). Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertile man. *Can Urol Assoc J*,3(6):479–485. doi:10.5489/cuaj.1180
127. Rodin DM, Larone D y Goldstein M. (2003). Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril*, 79(3):1555-1558.
128. Rodríguez BV y Santana F. (2008). Infecciones de transmisión sexual, calidad del semen e infertilidad. *Rev Cubana Endocrinol*, [Internet]. Dic [citado 2019 Nov 16]; 19(3). Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-29532008000300007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532008000300007&lng=es).

129. Rodríguez-Morales O., Pedro-Martínez E., Hernández-Pichardo JE., Alejandro-Aguilar R., Aranda-Fraustro A., Graullera-Rivera V., et al. (2014). Sperm morphological features associated with chronic chagas disease in the semen of experimentally infected dogs. *Am J Trop Med Hyg*,91: 810-815.
130. Rottem S. y Naot Y. (1998). Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol*,6,436–440.
131. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F y Weidner W. (2017). Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int*,114(19):339–346. doi:10.3238/arztebl.2017.0339
132. Schwabke JR y Hook EW. (2003). High Rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: Implications for screening and urethritis management. *J Infect Dis*,188: 465-468.
133. Seo R, Oyasu R y Schaeffer A. (1997). Blastomycosis of the epididymis and prostate. *Urology*,50: 980-982.
134. Sewald X, Motamedi N y Mothes W. (2016). Viruses exploit the tissue physiology of the host to spread in vivo. *Curr Opin Cell Biol*,41:81-90.
135. Shiadeh MN, Niyiyati M, Fallahi S y Rostami A. (20136). Human parasitic protozoan infection to infertility: A systematic review. *Parasitol Res*,115:469-477.
136. Shim BS. (2011). Current concepts in bacterial sexually transmitted diseases. *Korean J Urol*,52:589-97.
137. Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, et al. (2014). Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *Int J STD AIDS*,25(4):294-298.
138. Shulman A, Shohat B, Gillis D, Yavetz H, Homonnai ZT y Paz G. (1992). Mumps orchitis among soldiers: frequency, effect on sperm quality, and sperm antibodies. *Fertil Steril*, 57: 1344–1346
139. Siddiqui TJ, Zamani T y Parada JP. (2005). Primary cryptococcal prostatitis and correlation with serum prostate specific antigen in a renal transplant recipient. *J Infect*,51(3):e153-7.
140. Siemann DN, Strange DP, Maharaj PN, Shi PY y Verma S. (2017). Zika virus infects human sertoli cells and modulates the integrity of the *in vitro* blood-testis barrier model. *J Virol*,91: e00623-e00617.
141. Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Caspi E y Samra Z. (1990). Male genital mycoplasmas and *Chlamydia trachomatis* culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril*,53(2):331-336.
142. Solomon M y Henkel R. (2017). Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections. *Indian J Urol*,33(3):188-193. doi: 10.4103/iju.IJU\_407\_16.
143. Staib F, Seibold M, L'age M, Heise W, Skörde J, Grosse G, et al. (1989). *Cryptococcus neoformans* in the seminal fluid of an AIDS patient. A contribution to the clinical course of cryptococcosis. *Mycoses*,32:171-180.
144. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham PJ, Birkelund S y Christiansen G. (2003). *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod*,18: 2103-2109.
145. Sykes JA y Miller JN. (1971). Intracellular location of *Treponema pallidum* (Nichols strain) in the rabbit testis. *Infect Immun*,4(3):307–314.
146. Tayra E, Ashmaig A, Shareef H, Bedawi S y Aradaib I. (2010). Association of *Schistosoma mansoni* with infertility in a Sudanese patient from schistosomiasis area of endemicity: A case report. *Res J Med Sci*,4: 125-127.
147. Terpsidis K, Papazahariadou M, Taitzoglou I, Papaionnou N, Georgiadis M y Theodoridis I. (2009). *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. *Exp Parasitol*,121: 238-241.
148. Thayikkannu AB, Kindo AJ y Veeraraghavan M. (2015). Malassezia-Can it be Ignored?. *Indian J Dermatol*,60: 332-339.
149. Tian YH, Xiong JW, Hu L, Huang DH y Xiong CL. (2007). *Candida albicans* and filtrates interfere with human spermatozoal motility and alter the ultrastructure of spermatozoa: an in vitro study. *Int J Androl*,30: 421-429.
150. Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C y Peipert JF. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol*,216(1):1–9. doi:10.1016/j.ajog.2016.08.008
151. Turk S, Mazzoli S, Stsepetova J, Kuznetsova J y Mandar R. (2014). Coryneform bacteria in human semen: inter-assay variability in species composition detection and biofilm production ability. *Microb Ecol Health Dis*, 25.10.3402/mehd.v25.22701. doi: 10.3402/mehd.v25.22701
152. Uraki R, Hwang J, Ann K, Jurado K, Householder S, Yockey L, et al. (2017). Zika virus causes testicular atrophy. *Sci Adv*,3: 1-6.
153. Vicari E, La Vignera S, Castiglione R y Calogero AE. (2006). Sperm parameter abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostatic-vesiculo-epididymitis. *J Endocrinol Invest*,29:18-25.
154. Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R y Salgado A. (2002). *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia*,34(3):155-261.

155. Vignera S, Calogero A, Condorelli R, Vicari C, D'Agata M y Vicari R. (2011). Ultrasonographic evaluation of patients with male accessory gland infection. *Andrologia*,44: 26-31.
156. Villanueva CA, Echavarría MG y Armando JB. (2003). Bacteriospermia asintomática y esterilidad masculina. *Bol Col Mex Urol*,18(4): 145-148.
157. Vivas G, Lozano R y Velasco J. (2007). Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Invest Clin*,48:107-121.
158. Wada YA, Oniye SJ, Rekwot PI y Okubanio OO. (2016). Testicular pathology, gonadal and epididymal sperm reserves of Yankasa rams infected with experimental *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. *Vet World*,9: 759-765.
159. Wahid B, Bashir H, Bilal M, Wahid K y Sumrin A. (2017). Developing a deeper insight into reproductive biomarkers. *Clin Exp Reprod Med*,44(4):159-170. doi:10.5653/cerm.2017.44.4.159
160. Waters L, Gilling-Smith C y Boag F. (2007). HIV infection and subfertility. *Int J STD & AIDS*,8:1-6.
161. Weidner W, Pilatz A, Diemer JP, Bannister ER y Derrick FC. (1977). Interference of human spermatozoal motility and spermatozoal agglutination by *Candida albicans*. *J Urol*,118:797-799.
162. Westrom L. (1990). *Chlamydia trachomatis*- clinical significance and strategies of intervention. *Semin Dermatol*,9(2):117-125.
163. Wilson M. (2009). *Bacteriology of humans: an ecological perspective*: John Wiley & Sons.
164. Wise GJ, Talluri GS y Marella VK. (1999). Fungal and actinomycotic infections of the genitourinary system: manifestations, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am*, 26:701-718.
165. Witkin SS, Kligman I y Bongiovanni AM. (1995). Relationship between an asymptomatic male genital tract exposure to *Chlamydia trachomatis* and an autoimmune response to spermatozoa. *Hum Reprod*,10 (11):2952-2955.
166. Wolff H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting HC y Meurer M. (1991). *Chlamydia trachomatis* induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered semen quality. *Fertil Steril*,55: 1017-1019.
167. WHO. (2010). World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> Ed. Brazil: World Health Organization, pp. 67-71.
168. Wu T, Lu M, Hu Y, Guo Q y Xu C. (2004). [Influence of *Ureaplasma urealyticum* infection on the sperm-egg binding associated molecule, sulfogalactosylglycerolipid]. *Zhonghua Nan Ke Xue*,10(9):651-654.
169. Ying M, Jo F, Young K, Hong Y, Chia C y Feng P. (1997). The effect of Papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril*,67:1152-1155.
170. Zrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Badyda J y Galewska Z. (2008). The evaluation of markers of prostatic inflammation and function of the prostate gland in patients with chronic prostatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*,56(4):277-282.
171. Zea-Mazo JW, Negrette-Mejía YA y Cardona-Maya W. (2010). Virus de transmisión sexual: relación semen y virus. *Actas Urol Esp*,34:845-853.
172. Zhao Y, Zhang WD, Liu XQ, Zhang PF, Hao YN, Li L, et al. (2016). Hydrogen sulfide and/or ammonia reduces spermatozoa motility through AMPK/AKT related pathways. *Sci Rep*,6:37884. doi:10.1038/srep37884
173. ZhouXP, Hu XL, Zhu YM, Qu F, Sun SJ y Qian YL. (2011). Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B. *Asian J Androl*,13:465-469.
174. Zuleta-González MC, Zapata-Salazar ME, Guerrero-Hurtado LS, Puerta-Suárez J y Cardona-Maya WD. (2019). *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*: Passengers in the sperm travel. *Arch Esp Urol*,72(9):939-947.

# LA IMPORTANCIA Y LAS APLICACIONES DEL ANÁLISIS ESPERMÁTICO ASISTIDO POR COMPUTADORA (CASA) EN LABORATORIOS DE ANDROLOGÍA Y CENTROS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Gerhard van der Horst

Liana Maree

Laboratorio de Espermología Comparada, Departamento de Biociencia Médica Universidad del Cabo Occidental, Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

Autor Corresponsal: Dr. Gerhard van der Horst. Comparative Spermatology Laboratory, Department of Medical Bioscience, University of the Western Cape, Robert Sobukwe Rd. Bellville, 7535, South Africa; Tel: +27 21 554 5578; +27 82 202 3560. Correo electrónico de trabajo: [gydhorst@uwc.ac.za](mailto:gydhorst@uwc.ac.za), Correo electrónico alternativo: [gydhorst7@gmail.com](mailto:gydhorst7@gmail.com)

## Resumen

Comprender la importancia y la aplicación del análisis espermático asistido por computadora (CASA), en el examen de rutina de la calidad de los espermatozoides y la evaluación del potencial de fertilidad en el laboratorio de andrología.

## Contenido

1. Introducción a los métodos tradicionales y mejorados de evaluación del semen.
2. Una breve historia de CASA y la necesidad de una cuantificación objetiva de las características del semen.
3. Principios básicos de CASA y componentes de hardware esenciales requeridos.
4. Metodología CASA para evaluar los parámetros básicos del semen, incluida la concentración, motilidad y morfología del espermatozoide. Aparte de una mejor cuantificación (especialmente la motilidad y la morfología de los espermatozoides), ¿qué aporta la evaluación de las subpoblaciones al análisis de semen? ¿Es útil?
5. La CASA moderna también mide aspectos adicionales del esperma / semen, como la vitalidad, la fragmentación del ADN, la integridad acrosomal y el recuento de leucocitos.
6. Función de los espermatozoides evaluados por CASA, incluida la penetración de la mucosa espermática, la hiperactivación y la reacción acrosomal, para evaluar la fertilidad potencial de los espermatozoides humanos.
7. Uso de CASA en el laboratorio de andrología moderno, perspectivas futuras y conclusiones.

## Introducción a los métodos tradicionales y mejorados del análisis del semen

En la mayoría de los laboratorios de Andrología / Embriología a nivel mundial, el análisis de semen se basa principalmente en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). Entre 1980 y 2021, se publicaron seis manuales de la OMS y el título actual es "Manual de laboratorio de la OMS para el



examen y procesamiento del semen humano” (1). Además, ESHRE ha desarrollado un sistema de acreditación que se basa en gran medida en las directrices de la OMS. La **Tabla 1** describe la historia de los manuales que muestra cómo se han ajustado los valores de referencia de corte para algunos parámetros de semen / esperma, durante las últimas cuatro décadas. La **Tabla 2** muestra los límites / rangos de semen o parámetros de esperma más recientes de los resultados del examen de semen, en parejas que comienzan un embarazo dentro de un año de relaciones sexuales sin protección y conducen a una concepción natural (1).

La sexta edición del manual de la OMS (OMS 6) hace hincapié en que todos los aspectos de la eyaculación y la eyaculación en sí, deben evaluarse mediante procedimientos debidamente estandarizados para que los resultados proporcionen información confiable (1). El nuevo manual parece ser una mejora considerable con respecto a la quinta edición, (2) y ha abandonado secciones redundantes como las interacciones de las zonas espermáticas con el moco cervical. En cambio, se ha centrado más en las pruebas funcionales de los espermatozoides, incluida la fragmentación del ADN, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la reacción acrosomal. Si bien es refrescante que se hayan ampliado algunas secciones, por ejemplo, el uso del análisis espermático asistido por computadora (CASA) con fines de investigación, esta técnica de análisis aún no ha recibido el reconocimiento que merece como extremadamente útil en el análisis de semen de rutina en el laboratorio de Andrología. De alguna manera parece contradictorio que, a pesar de la implementación del control de calidad, los métodos manuales subjetivos como en la OMS se consideren más preferibles y aceptables que la metodología claramente más cuantitativa y objetiva de CASA. Hay un número creciente de artículos (3, 4) que han demostrado que CASA es más consistente con coeficientes de variación considerablemente más pequeños, en comparación con los métodos de análisis manual.

En las secciones siguientes se mostrará que la tecnología CASA ha mejorado mucho durante la última década, y ahora mide la mayoría de los parámetros que se evalúan manualmente de acuerdo con la OMS.

**Tabla 1:** Valores de corte de referencia para las características seminales según los diferentes manuales de la OMS.

Semen parameter	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010 <sup>1</sup>	WHO 2021
<b>Volume (mL)</b>	ND	≥2	≥2	≥2	1.5	1.4
<b>Sperm concentration (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	20-200	≥20	≥20	≥20	15	16
<b>Total sperm number (x10<sup>6</sup>)</b>	ND	≥40	≥40	≥40	39	39
<b>Total motility (%)</b>	≥60	≥50	≥50	≥50	40	42
<b>Progressive motility (%)<sup>2</sup></b>	≥2 <sup>3</sup>	≥25	≥25 (grade a)	≥25 (grade a)	32 (a+b)	30
<b>Vitality (%)</b>	ND	≥50	≥75	≥75	58	54
<b>Normal morphology (%)</b>	80.5	≥50	≥30 <sup>4</sup>	(14) <sup>5</sup>	4 <sup>6</sup>	4 <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Lower reference limits generated from the lower fifth centile value

<sup>2</sup> Grade a = rapid progressive motility (> 25 µm/s), Grade b = slow/sluggish progressive motility (5-25 µm/s)

<sup>3</sup> Forward progression (scale 0-3)

<sup>4</sup> Arbitrary value

<sup>5</sup> Value not defined but strict criterion is suggested

<sup>6</sup> Strict (Tygerberg) criterion

ND = not defined

**Tabla 2.-** Distribución de los resultados del análisis de semen de varones con parejas que consiguieron una gestación dentro de un año de relaciones sexuales sin protección (tabla adoptada del manual de la OMS de 2021).

Semen parameter	Centiles									
	2.5th	5th	(95% CI)	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97.5th
Volume (mL)	1.0	1.4	(1.3-1.5)	1.8	2.3	3.0	4.2	5.5	6.2	6.9
Sperm concentration (x10 <sup>6</sup> /mL)	11	16	(15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Total sperm number (x10 <sup>6</sup> )	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Total motility (%)	35	42	(40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Progressive motility (%)	24	30	(29-31)	36	45	55	63	71	77	81
Non-progressive motility (%)	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Immotile sperm (%)	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitality (%)	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Normal morphology (%)	3	4	(3.9-4.0)	5	8	14	23	32	39	45

### Una breve historia de CASA y la necesidad de una cuantificación objetiva de las características del semen

Las investigaciones sobre el análisis de los espermatozoides en forma automatizada comenzaron hace cinco décadas y al principio solo se centraron en el seguimiento del movimiento de los espermatozoides. La década de 1970 estuvo marcada por la investigación realizada por el grupo del profesor George David en París y el grupo del Dr. Hector Dott en Cambridge (Reino Unido) (5),

que desarrollaron, entre otros, la cine-micrografía para cuantificar la motilidad de los espermatozoides. Los doctores David Katz y James Overstreet ampliaron este trabajo sobre microcinematografía de espermatozoides, que posteriormente fue seguido por van der Horst y Samuels (1984) (6) y Samuels y van der Horst (1986) (7). A esto le siguieron los primeros resultados de CASA independientes publicados por Katz y col. (1989) (8), Davis y col. (1995) (9) y Mortimer, (1997) (10). En estas investigaciones se intentó principalmente cuantificar la motilidad de los espermatozoides (porcentaje de motilidad y motilidad progresiva) y específicamente cinemática como la velocidad de nado de los espermatozoides (incluyendo VCL = velocidad curvilínea; VAP = velocidad de trayectoria promedio; LIN = linealidad y ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza).

Estos estudios básicos ayudaron a proporcionar una base científica para el desarrollo de sistemas CASA en relación con la concentración, la motilidad y el análisis de la morfología de los espermatozoides durante la década de 1990. En las siguientes dos décadas, se lograron grandes avances en la mejora de estos aspectos, particularmente en relación con desarrollos significativos en el desarrollo de hardware y software de computadoras, así como en inteligencia artificial. En consecuencia, CASA se ha ampliado para incluir aspectos de la funcionalidad de los espermatozoides, como la penetración espermática en moco cervical, hiperactivación, vitalidad, fragmentación del ADN y la reacción acrosomal. Los tres atributos más importantes relacionados con estos desarrollos en CASA son la velocidad de análisis, la cuantificación de los parámetros espermáticos básicos y la medición de muchos parámetros que no son posibles de analizar manualmente.

Los cinco niveles de automatización en la práctica médica deben comprenderse y pueden aplicarse a la cuantificación objetiva de la calidad del semen (11). A continuación se muestran ejemplos relacionados con el semen / análisis de espermatozoides.

- Análisis humano o manual solo cuando un técnico o un andrólogo hace un juicio sobre el porcentaje de motilidad en una muestra mediante simple observación microscópica y utilizando, por ejemplo, las pautas WHO 5 / 6. Se ha demostrado que esto es subjetivo y, por tanto, muy variable.
- Modo de sombra donde los videos de datos y / o motilidad (\* .avi / mp4) o las imágenes de morfología se guardan en una base de datos para volver a verificar y controlar la calidad. Sin embargo, la llamada a juicio para la calificación de la motilidad, por ejemplo, aún reside en el técnico. Dado que más de una persona puede acceder a los distintos videos / imágenes, el resultado puede ser menos variable pero aún subjetivo.
- La asistencia de inteligencia artificial en el contexto de los espermatozoides, se refiere a lo que pueden hacer la mayoría de los sistemas CASA actuales. En este caso, las características de los espermatozoides, como la concentración, motilidad y morfología espermática, son analizadas por la computadora, pero se necesita una persona calificada para revisar y corregir los resultados y tomar una decisión final. Los pasos cruciales que miden las características de los espermatozoides se realizan de manera objetiva sin interferencias, pero aún pueden ser propensos a errores humanos finales en términos de corrección e interpretación.
- La automatización parcial es una forma aún más avanzada de inteligencia artificial (IA) en la que el análisis se realiza automáticamente como se indicó anteriormente, pero el sistema ahora puede generar un diagnóstico, como se puede encontrar en algunos sistemas CASA modernos como el *Sperm Class Analyzer* (Microptic SL). Sin embargo, los resultados deben ser revisados por un experto y pueden

modificarse en un informe final. A pesar de algunas de las deficiencias, estos sistemas proporcionan una base sólida con menos variación, más precisión y mejores resultados que los tres primeros niveles.

- Automatización completa. En este caso, el análisis e interpretación de la IA se realiza en su totalidad por la computadora sin interferencia humana, modificación o interpretación. Solo un sistema en el campo de la espermatología se acerca a esto, pero aún tiene elementos humanos y ese es el SCAScope de Microptic. En este caso, un técnico carga las muestras y "se aleja" y regresa 15 minutos más tarde para encontrar un análisis, un informe y una interpretación completos. Sin embargo, incluso en este caso, el resultado final puede revisarse y ajustarse.

¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los sistemas CASA? A pesar de algunas deficiencias, los sistemas CASA con tecnología de IA de vanguardia, son precisos, fáciles de usar y siempre es posible validar la exactitud de los resultados mediante controles de calidad externos e internos. CASA también es considerablemente más rápido que los métodos manuales y puede generar resultados cuantitativos y principalmente objetivos. CASA produce una gran cantidad de parámetros que son importantes para comprender mejor la funcionalidad de los espermatozoides y muchos de estos parámetros no se pueden evaluar manualmente. Las desventajas de los sistemas CASA se asocian principalmente con detectar correctamente solo espermatozoides y que el operador no observa los protocolos e introduce variables y consecuentemente elementos de subjetividad. Una persona que no tiene experiencia con el análisis manual generalmente será inexperta con el análisis CASA. El hecho de que CASA esté en gran parte automatizada no significa que aspectos como la correcta configuración óptica, el control de la temperatura y el manejo del semen, se observen y realicen adecuadamente.

Hay una serie de sistemas CASA de buena reputación que se utilizan actualmente y cada vez más en el entorno clínico, vistos en varios artículos que muestran el análisis manual con más subjetividad y variabilidad. Por otra parte, la evaluación cuantitativa de la funcionalidad de los espermatozoides ahora es posible utilizando CASA.

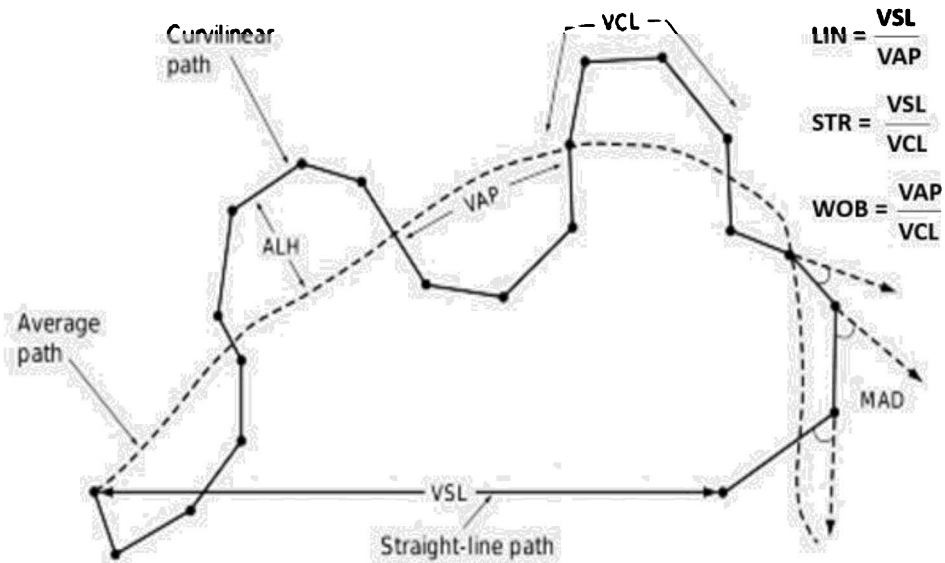
### Principios básicos de CASA y componentes de *hardware* esenciales requeridos

La base del análisis de imágenes de objetos en movimiento (motilidad de los espermatozoides), es que la cabeza de los espermatozoides debe reconocerse contra un fondo contrastante. En consecuencia, se puede seguir la cabeza de los espermatozoides y esto se denomina seguimiento del centroide. La **Figura 1** es una representación esquemática del seguimiento del centroide de la cabeza del espermatozoide cada 50 de segundo.



**Figura 1:** Análisis del centroide utilizando la cabeza del espermatozoide como punto de referencia para el seguimiento (ilustración con permiso de Microptic SL, Barcelona, España). Rojo = espermatozoides progresivos rápidos; Azul = espermatozoides lentos/no progresivos, Amarillo = espermatozoides inmóviles.

El seguimiento basado en centroides da como resultado varios parámetros cinemáticos que pueden cuantificarse (**Figura 2**) y usarse como puntos de corte, para expresar aspectos como el porcentaje de motilidad progresiva e incluso la hiperactivación (se discutirá en las secciones 4 y 6). Se pueden utilizar tres tipos de microscopía para el seguimiento de los espermatozoides, estas son: contraste de fase positivo, contraste de fase negativo y microscopía de fluorescencia.

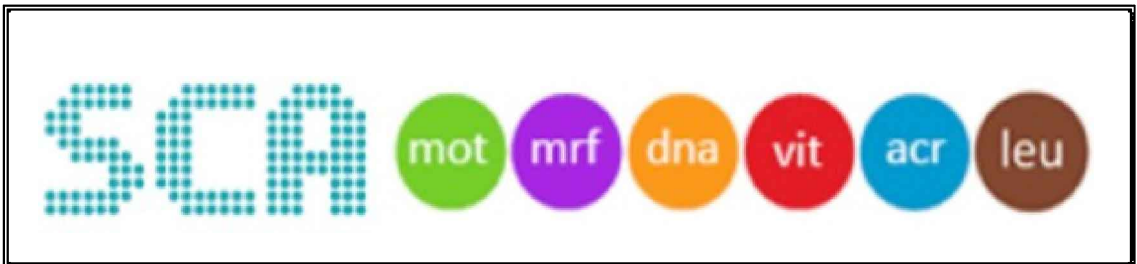


**Figura 2:** Los puntos negros se refieren al seguimiento del centroide de la cabeza cada 50 parte de segundo. Las cinéticas que se pueden determinar y derivar: VCL, VSL, VAP, ALH y MAD, así como tres derivadas, a saber, LIN, STR, WOB (consulte también la **Tabla 3**). VCL = velocidad curvilínea, VSL = velocidad en línea recta, VAP = velocidad de trayectoria promedio, ALH = amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, MAD = desplazamiento angular medio, LIN = linealidad, STR = rectitud, WOB = oscilación.

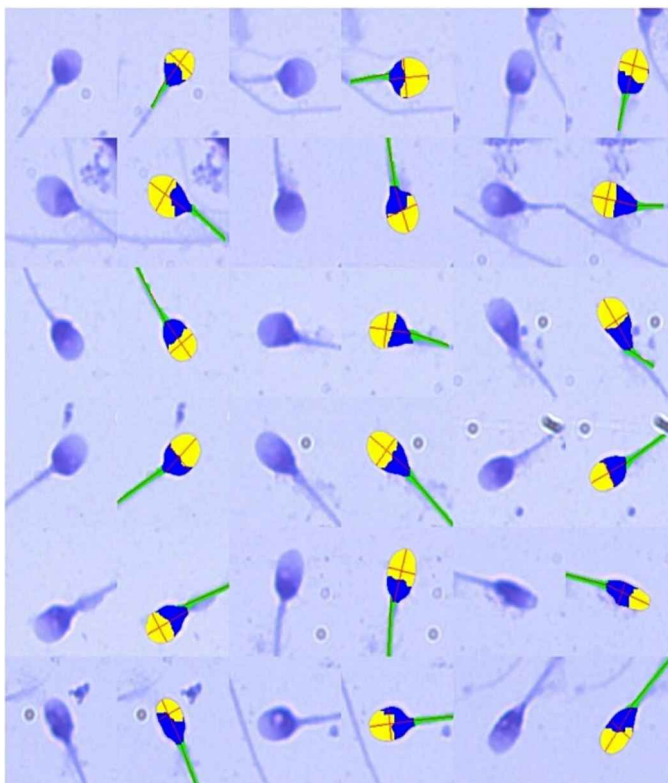
La mayoría de los sistemas CASA utilizan microscopía de contraste de fase negativa para el seguimiento de los espermatozoides, donde la cabeza de los espermatozoides aparece blanca sobre un fondo negro; sin embargo, esta configuración se utiliza principalmente para los espermatozoides de animales. El semen humano contiene muchas partículas de diferentes formas y tamaños, y algunas de estas partículas, tienen el mismo tamaño que la cabeza del espermatozoide. En consecuencia, muchas de estas partículas se reconocen como "espermatozoides inmóviles", ya que son estacionarias. Además, simultáneamente con la medición de la motilidad de los espermatozoides, se determina la concentración de espermatozoides, ya que se supone que el número de espermatozoides que nadan fuera del campo es equivalente a los espermatozoides que nadan en el campo de visión. Entonces es concebible que si algunas de las partículas (principalmente de origen prostático) en el semen se consideran "espermatozoides", la medición de la concentración de espermatozoides y el porcentaje de motilidad de los espermatozoides se calcularán de manera inexacta. Por lo tanto, la microscopía de contraste de fase positiva debe usarse preferiblemente para el análisis de la motilidad del semen humano y la concentración de espermatozoides, ya que la mayoría de las partículas aparecen como imágenes grises o negras en el fondo, mientras que las cabezas de los espermatozoides son predominantemente blancas y los filtros del *software* solo detectarán los espermatozoides con cabezas blancas. Los sistemas CASA modernos, como los de *Hamilton Thorne (Beverly, MA, EE. UU.* y el *Sperm Class Analyzer* (Microtic SL, Barcelona, España), utilizan filtros inteligentes (modo blanco y negro avanzado) y controlan la presencia de la cola del espermatozoide, para eliminar partículas en el plasma seminal que se pudiesen detectar como espermatozoides (5,12).

La microscopía de fluorescencia es costosa, pero si los espermatozoides se tiñen con Hoechst (H33258, tiñe el material nuclear) y se emplea un filtro de fluorescencia DAPI, solo las cabezas de los espermatozoides emitirán fluorescencia y, en consecuencia, se puede realizar un seguimiento de alta precisión utilizando el modo de seguimiento de fluorescencia en la configuración del *software*. Esto es particularmente útil para las llamadas muestras de "semen sucio" que contienen muchas mucosas, partículas y bacterias.

También se han desarrollado módulos CASA con bibliotecas para la cuantificación de la morfología, vitalidad, la fragmentación del ADN, la integridad / reacción acrosomal de los espermatozoides y el conteo de leucocitos (**Figura 3**). Para cada uno de estos aspectos, se utilizan tinciones apropiadas que teñirán partes individuales de los espermatozoides de manera diferente. Por ejemplo, *SpermBlue*, utilizado para la evaluación de la morfología, tiñe el acrosoma, la cabeza, la pieza intermedia y la cola del espermatozoide en diferentes tonos de azul. Posteriormente, se han desarrollado bibliotecas de software de morfología espermática que limitan las diferentes partes de los espermatozoides para el análisis automatizado (**Figura 4**). De manera similar, se han determinado los umbrales de los componentes de los espermatozoides teñidos y los puntos de corte específicos para varios aspectos estructurales y funcionales de los espermatozoides (véanse las secciones 5 y 6).



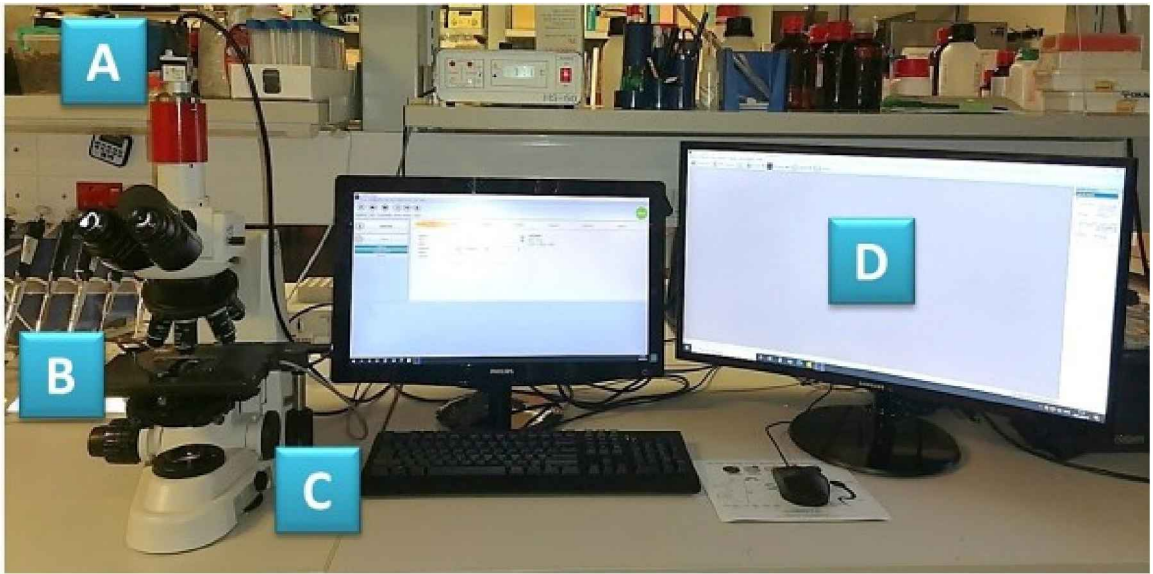
**Figura 3:** Ejemplos de diferentes módulos CASA de un sistema como el Sperm Class Analyzer para motilidad, morfología, fragmentación (ADN), vitalidad, acrosoma y recuento de leucocitos (ilustración con autorización de Microptic SL, Barcelona, España).



**Figura 4:** Umbral de software para el análisis de la morfología de los espermatozoides que indica el acrosoma (amarillo), la cabeza (azul), la pieza intermedia y la cola (verde). Espermatozoides individuales teñidos con SpermBlue mostrados en el lado izquierdo y su imagen analizada en el lado derecho inmediato.

La **Figura 5** indica una configuración de sistema CASA convencional. Se requiere un microscopio de contraste de fase positivo de buena calidad con objetivos de 10x, 20x, 40x y 60x y una platina térmica que pueda controlar la temperatura de los portaobjetos de vidrio, como Leja 20  $\mu\text{m}$  de profundidad, a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Para la detección de espermatozoides se requiere una cámara digital en color como Basler aCA 1300 – 200 uc con una frecuencia de cuadros de al menos 50 cuadros por

segundo (fps). El software se instala en una computadora con al menos una CPU Intel (R) Core (TM) i5-6200U a 2.30 GHz y preferiblemente 8 RAM, una unidad SSD y puertos USB3 para la cámara digital.



**Figura 5:** Configuración del sistema CASA convencional con un microscopio de contraste de fase totalmente equipado. A) Cámara digital (Basler ace acA 1300-200uc color USB 3.0), B) Platina calentada, C) Microscopio Nikon Eclipse 50i, D) Computadora con software SCA® para análisis CASA (ilustración con autorización de Janice Murray, 2021).

La **Figura 6** muestra la configuración de hardware típica para un laboratorio de rutina, así como para fines de investigación. Esencialmente, se requieren los mismos componentes básicos que se muestran en la **Figura 5** para el análisis CASA convencional. Además, un sistema motorizado hace posible un análisis automatizado más completo, por ejemplo, la evaluación de la morfología de los espermatozoides durante la noche. Se requiere microscopía de fluorescencia para análisis avanzados como la reacción acrosomal (PNA-FITC), la fragmentación del ADN y el seguimiento de espermatozoides de muestras muy sucias en modo de fluorescencia.



**Figura 6:** Configuración del sistema CASA similar a la Fig. 5, pero con etapa motorizada completamente automatizada y epifluorescencia para el seguimiento de espermatozoides de muestras sucias, reacción del acrosoma y detección de fragmentación de fluorescencia. También se muestra una balanza (extremo izquierdo) para determinar el peso del volumen de semen (ilustración con permiso de Microptic SL, Barcelona, España).

La **Figura 7** presenta el primer desarrollo totalmente automatizado en CASA, el SCA SCOPE, que requiere una mínima preparación y capacitación en análisis de semen del personal técnico y puede analizar la motilidad, morfología, vitalidad, fragmentación del ADN y conteo de leucocitos

(inflamación) en un período corto de tiempo, sin la presencia de una persona y proporciona un informe detallado. La ventaja de esta tecnología es que está totalmente automatizada, utiliza metodología cuantitativa y proporciona un análisis objetivo sin sesgos por parte de un técnico.



**Figura 7:** El SCA SCOPE es el primer sistema CASA totalmente automatizado que analiza la motilidad, la morfología, la vitalidad, el recuento de leucocitos y el pH de los espermatozoides de una muestra en 15 minutos (ilustración con autorización de Microptic SL, Barcelona, España).

### **Metodología CASA para evaluar parámetros seminales básicos**

Un seminograma generalmente incluye la evaluación tanto de las características físicas del semen (color, volumen, pH, viscosidad y licuefacción) como de otras características del espermatozoide (concentración, motilidad y morfología). CASA y sus metodologías relacionadas (consumibles y microscopía) se pueden utilizar para evaluar varios parámetros básicos del semen, como la viscosidad y los parámetros del espermatozoide.

### **Viscosidad del semen**

Además del método manual para determinar la viscosidad (1,2), este parámetro del semen también se puede medir como la cantidad de segundos que se tarda en llenar una cámara de recuento cargada con capilares (utilizada para la evaluación de la concentración y la motilidad de los espermatozoides, ver más abajo). La técnica requiere cargar una alícuota de semen (3 µl) en un portaobjetos Leja de cuatro cámaras y 20 µm de profundidad precalentado (37°C) y registrar el tiempo de llenado (13). La viscosidad en centipoise (cP) se puede determinar posteriormente mediante la siguiente ecuación:

$$y = 0,34x + 1,34$$

donde  $y$  = viscosidad en cP y  $x$  = tiempo de llenado en segundos (13).

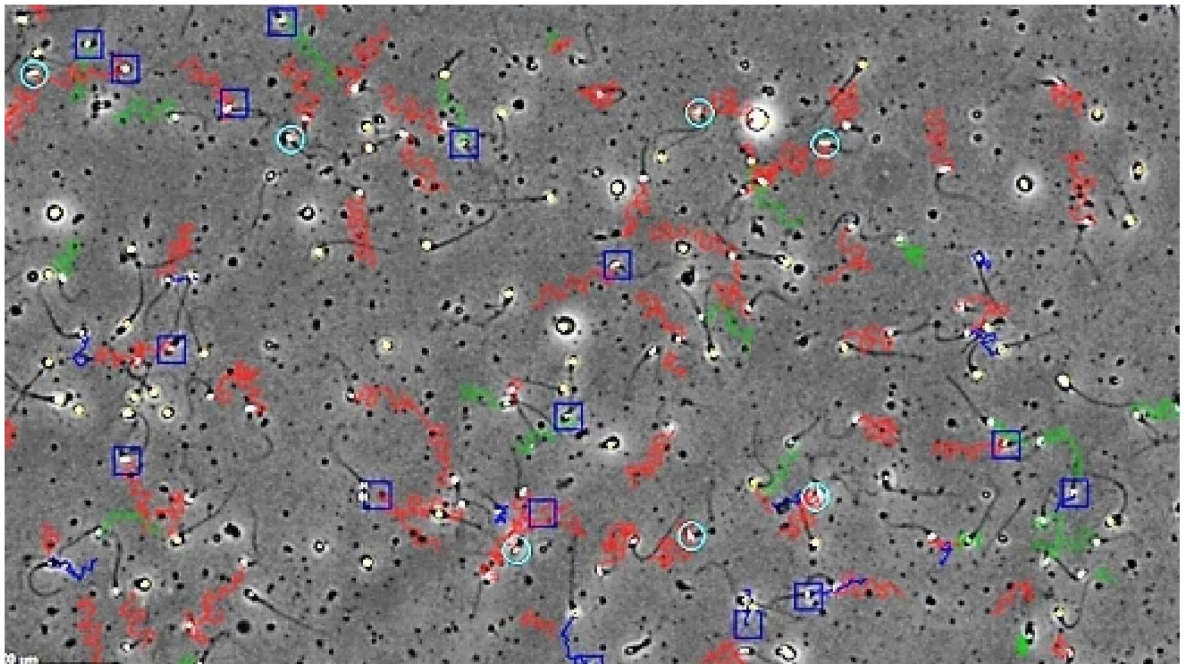
Una muestra con viscosidad normal tendrá un tiempo de llenado mucho más rápido (por ejemplo, 10 segundos y 4,7 cP) en comparación con una muestra hiperviscosa (por ejemplo, 22 segundos y 8,8 cP). La hiperviscosidad del semen probablemente se debe a una disfunción de las glándulas sexuales accesorias masculinas (14) y se asocia con una mala calidad del semen, motilidad de los espermatozoides y bajos resultados con la FIV (15,16).

### **Concentración de espermatozoides**



CASA permite determinar la cantidad de espermatozoides presentes en una muestra de semen o preparación de esperma junto con la motilidad de los espermatozoides una vez que se ha cargado la cámara de conteo. Dependiendo del método preferido, se pueden utilizar cámaras de conteo por desplazamiento de gotas reutilizables (p. Ej., Makler y Neubauer) o cámaras de conteo cargadas por capilares desechables (p. Ej., Leja y *CellVision*) para medir la concentración de espermatozoides.

Debido a la naturaleza inherente del semen humano que tiene una variación considerable en términos de viscosidad, presencia de células no espermáticas y detritos, agregaciones de espermatozoides y morfología heterogénea, los sistemas de análisis de imágenes están sujetos a errores en la discriminación entre espermatozoides o espermatozoides individuales y materia no espermática. (3,5). Como se mencionó en la Sección 3, es fundamental que el software CASA deba detectar correctamente las cabezas de los espermatozoides para poder determinar con precisión la concentración de espermatozoides (Fig. 8). Si se incluye materia no espermática en el análisis automatizado, resultará en una sobreestimación de la concentración de espermatozoides y una subestimación de la motilidad de los espermatozoides.



**Figura 8:** Análisis de motilidad espermática CASA a 50 fotogramas por segundo utilizando el software Sperm Class Analyzer. El campo analizado ilustra la correcta detección y seguimiento de espermatozoides individuales en una muestra de semen o preparación de esperma. La caracterización de las subpoblaciones de motilidad incluye: pistas rojas = esperma de natación rápida; pistas verdes = espermatozoides de natación media; pistas azules = espermatozoides que nadan lentamente; y círculos amarillos = esperma inmóvil. También se indican en rectángulos azules los espermatozoides que pasan la prueba de penetración de la mucosa espermática y en círculos turquesas los espermatozoides que poseen características de motilidad hiperactivada.

Las muestras de semen con una concentración de esperma extremadamente alta deben diluirse con plasma seminal del mismo donante / paciente (1) para permitir que CASA detecte todos los espermatozoides. El semen con alta viscosidad se puede lavar (centrifugar durante 10 min a 350 g) con un medio de lavado / tampón de esperma adecuado (por ejemplo, *ALLGrad Wash* o *PureSperm*) y re suspender nuevamente para eliminar los componentes del líquido seminal.

Al ingresar el volumen original de la muestra de semen, el *software* de CASA también informará automáticamente sobre el número total de espermatozoides en el eyaculado (recuento de espermatozoides). Este valor es importante para los cálculos posteriores del número / porcentaje de espermatozoides en un eyaculado que presentan características específicas relacionadas con la fertilidad potencial, p. Ej. motilidad progresiva, hiperactivación y morfología normal.

## Motilidad de los espermatozoides

Se determinan varios porcentajes habituales de motilidad de los espermatozoides con análisis de semen tanto manuales como automatizados (por ejemplo, motilidad total, progresivos rápidos, progresivos lentos, no progresivos e inmóviles), como recomienda la OMS (1). Además, CASA puede evaluar las características del movimiento de los espermatozoides que son prácticamente imposibles con el análisis manual, mediante la medición de subpoblaciones de motilidad específicas y parámetros cinemáticos (consulte la **Tabla 3** para conocer los parámetros de motilidad de CASA). Por ejemplo, CASA usa valores de corte para parámetros cinemáticos específicos (**Tabla 3**) para evaluar la proporción de espermatozoides en la eyaculación o fracción de espermatozoides, que tienen propiedades de penetración en el moco cervical e hiperactivación (**Fig. 8**).

**Tabla 3:** Movilidad espermática y parámetros espermáticos analizados mediante CASA.

Motility	Morphology
<i>Percentages</i>	<i>Morphology</i>
Total motility	Normal (%)
Progressive motility	Abnormal (%)
Rapid progressive (Type a*)	Head defects (%)
Slow progressive (Type b*)	Midpiece defects (%)
Non-progressive (Type c*)	Tail defects (%)
Immotile (Type d*)	Cytoplasmic droplets (%)
Rapid <sup>#</sup> (R)	Acrosome coverage (%)
Medium <sup>#</sup> (M)	Teratozoospermia index (TZI)
Slow <sup>#</sup> (S)	Multiple anomalies index (MAI)
Sperm mucous penetration (SMP)	Sperm deformity index (SDI)
Hyperactivation (HA)	<i>Morphometry</i>
<i>Kinematics</i>	Head length (µm)
VCL (µm/s)	Head width (µm)
VAP (µm/s)	Head area (µm <sup>2</sup> )
VSL (µm/s)	Head perimeter (µm)
LIN (%)	Head ellipticity
STR (%)	Head elongation
WOB (%)	Head roughness
ALH (µm)	Head regularity
BCF (Hz)	Midpiece width (µm)

<i>Cut-offs</i>	
R: VCL>89 $\mu\text{m/s}$	
M: 89<VCL>60 $\mu\text{m/s}$	
S: 60<VCL>23 $\mu\text{m/s}$	
SMP: VAP>25 $\mu\text{m/s}$ , STR>80%, ALH>2.5(5)”	
HA: VCL>150 $\mu\text{m/s}$ , LIN<50%, ALH>3.5(7)”	

\* According to WHO4 (WHO, 1999)

# Sperm swimming speed according to CASA sort function, as recommended in RFD, 2018

“ Cut-off values as recommended in MOF (2017), ALH values given are for Sperm Class Analyzer, ALH values in brackets are for other CASA systems using the full VCL wave to calculate ALH

VCL = curvilinear velocity, VAP = average path velocity, VSL = straight-line velocity, LIN = linearity, STR = straightness, WOB = wobble, ALH = amplitude of lateral head displacement, BCF = beat cross frequency

Una vez que se han determinado los porcentajes de motilidad de los espermatozoides, se comparan con los valores de referencia de la OMS para cada clase (**Tabla 2**), con el fin de predecir un diagnóstico de la calidad de los espermatozoides (p. Ej., Astenozoospermia), a menudo en combinación con la evaluación de la concentración y morfología de los espermatozoides (p. Ej. oligoastenozoospermia). La notificación de la motilidad especialmente progresiva es importante, ya que este parámetro de motilidad está relacionado con las tasas de fecundación y embarazo (17,18). Además, los parámetros de velocidad de los espermatozoides (VCL, VAP y VSL) han demostrado ser predictores de embarazo por IIU e ICSI (19,20).

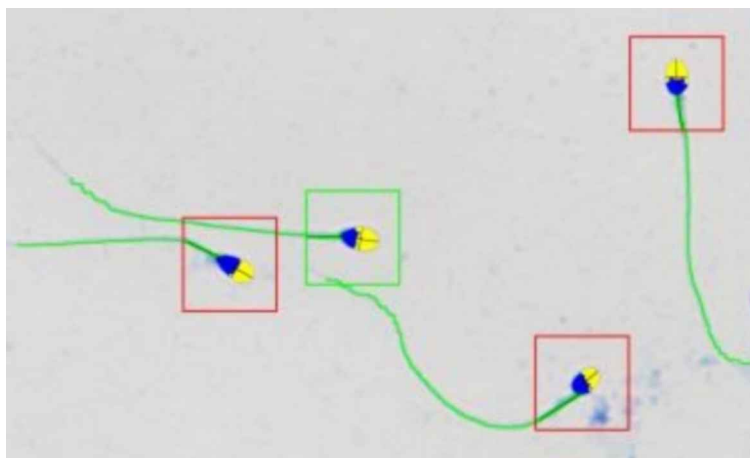
La precisión de la motilidad de los espermatozoides evaluados con CASA, depende de la concentración de espermatozoides del semen o de la preparación de los espermatozoides cargados en la cámara, así como de la profundidad de la cámara. Se ha recomendado ampliamente que la concentración de espermatozoides debe estar entre  $2 \times 10^6$  / ml y  $50 \times 10^6$  / ml (21) para evitar colisiones entre espermatozoides cercanos, agitación de espermatozoides inmóviles o demasiada superposición de trayectorias de movimiento de los espermatozoides (1) lo que podría resultar en registrar *tracks* incorrectas de espermatozoides. Una profundidad de la cámara de 20  $\mu\text{m}$ , es adecuada para adaptarse al patrón helicoidal en el que los espermatozoides nadan en medios fisiológicos, y el movimiento hiperactivo que generan los espermatozoides en los medios de capacitación (22,23). Los *tracks* de al menos 200 espermatozoides móviles deben analizarse por muestra utilizando un objetivo de contraste de fase positivo 10x, un filtro verde y una platina térmica del microscopio. Si es posible, se deben analizar al menos 400 espermatozoides móviles, para evaluar de manera confiable las diversas clases de movimiento de los espermatozoides (1).

### **Morfología de los espermatozoides**

El análisis de morfología espermática asistido por computadora (CASMA) utiliza algoritmos para evaluar varios parámetros de morfometría de espermatozoides (**Tabla 3**) y, posteriormente, detecta anomalías similares en los componentes de los espermatozoides según lo recomendado por la OMS (1) para el análisis manual (24). La medición de las características morfométricas detalladas de los espermatozoides no solo es vital para la determinación objetiva, reproducible y rápida de las formas normales frente a las anormales, sino que tiene aplicaciones directas en toxicología (25) y

se ha demostrado que tiene correlaciones con la motilidad progresiva (26). Para asegurar la precisión y repetibilidad de CASMA, se debe tener cuidado con los pasos básicos de preparación de portaobjetos, seleccionar tinciones que no afecten las dimensiones de los espermatozoides y utilizar las configuraciones correctas de hardware y software (27).

En general, se pueden utilizar preparaciones tanto en fresco como espermatozoides teñidos, para evaluar la morfología de los espermatozoides con CASMA. El número de espermatozoides en el portaobjetos debe ser adecuado para tener una muestra representativa de la muestra de semen, o de la preparación de espermatozoides, pero una concentración demasiado alta de espermatozoides, hará que las colas de los espermatozoides se superpongan y podría resultar en una detección incorrecta, o ausencia de detección de los espermatozoides individuales por el *software*. Debido a que varios fijadores y tinciones disponibles comercialmente, contienen diferentes productos químicos que pueden influir en la morfometría de la cabeza del esperma (28), las especificaciones de la tinción espermática utilizada es importante para ayudar a proporcionar una captura, un umbral y una medición precisos de todos los componentes del esperma (**Figura 9**) por CASMA. Preferiblemente, se debe seleccionar un fijador y un colorante que solo fijen los espermatozoides en el portaobjetos (evitando las partículas teñidas de fondo adyacentes o superpuestas con los espermatozoides), que sea isotónico o isosmótico al semen recién eyaculado o espermatozoides expuestos a un medio fisiológico, y que no causen encogimiento o hinchazón de cualquier componente del esperma (27,29). La morfología de los espermatozoides de al menos 200 espermatozoides debe analizarse por muestra (en diferentes partes del portaobjetos), utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 60x o 100x y óptica de campo claro (1).



**Figura 9:** Análisis de morfología CASA utilizando el software Sperm Class Analyzer y tinción SpermBlue. El campo analizado ilustra el umbral preciso de cada componente del esperma contra un fondo limpio/claro. La clasificación de la morfología de los espermatozoides incluye: bloques verdes = morfología espermática normal y espermatozoides anormales en bloques rojos (ilustración con permiso de Microptic SL, Barcelona, España).

Además de informar sobre el porcentaje de morfología normal de los espermatozoides, y las anomalías de los espermatozoides (cabeza, cola, pieza intermedia y gotitas citoplasmáticas), los sistemas CASA modernos determinan índices de múltiples defectos en los espermatozoides. Los tres índices más comúnmente calculados incluyen el índice de teratozoospermia (TZI), el índice de anomalías múltiples (MAI) y el índice de deformidad espermática (SDI) (1). Dado que estos índices combinan más de una anomalía por espermatozoide de diferentes formas, es una expresión más poderosa de la anomalía espermática. Por ejemplo, cuando dos pacientes tienen un 6% de espermatozoides normales pero uno de ellos tiene un TZI mucho más alto que el otro (por ejemplo, 2.9 frente a 1.7), es probable que el paciente con un TZI más alto esté en mayor desventaja en términos de su potencial de fertilidad. (27).

## Subpoblaciones de espermatozoides

Los eyaculados humanos contienen diversas subpoblaciones de espermatozoides con marcadas diferencias en sus características funcionales, estructurales y bioquímicas (véanse las subpoblaciones indicadas en la Fig. 8) (30,31). Estas subpoblaciones deben evaluarse en lugar de depender simplemente de los valores medios de todo el eyaculado, lo que simplifica demasiado el análisis y, a menudo, no es un reflejo fiel del potencial de fertilidad masculino (CASA RFD). Por ejemplo, la evaluación de la motilidad progresiva rápida y la capacidad de penetración espermática en el moco cervical, pueden ayudar al andrólogo a determinar si un eyaculado contiene espermatozoides funcionales suficientes para alcanzar, y fertilizar potencialmente el ovocito (5,17), así como el nivel de TRA que podría necesitar una pareja infértil (32).

Si bien algunas subpoblaciones de motilidad de los espermatozoides (por ejemplo, velocidad de nado de los espermatozoides, hiperactivación y penetración espermática en moco cervical) ya están incorporadas en los sistemas CASA, se pueden evaluar otras subpoblaciones de motilidad y morfología agregando manualmente ciertos valores de corte de los parámetros de los espermatozoides en una función de "clasificación" (**Tabla 3**). El software CASA determinará automáticamente qué porcentaje de la población de espermatozoides evaluados presenta tales características (33). Si bien los CASMA se basan en valores de corte mínimos y máximos para las mediciones de la cabeza, la pieza media y la cola del espermatozoide, así como la cobertura del acrosoma, se pueden evaluar características morfológicas de interés adicionales de los espermatozoides mediante el establecimiento de cortes mediante el análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC por sus siglas en inglés) o Intervalos de confianza del 90-95% (5,34,35).

## Características adicionales de los espermatozoides evaluadas por CASA

Además de la morfología y morfometría de los espermatozoides, los sistemas CASA modernos son capaces de evaluar varias otras características de los espermatozoides que son esenciales para la evaluación de la calidad del semen / espermatozoides humanos, incluida la vitalidad, la fragmentación del ADN, la integridad acrosomal y el conteo de leucocitos. Estos ensayos adicionales son especialmente útiles para dilucidar las anomalías estructurales de los espermatozoides que son el resultado de la producción de espermatozoides (durante la espermatogénesis y, más específicamente, la espermiogénesis), así como el transporte y almacenamiento de los espermatozoides (a través del tracto reproductor masculino).

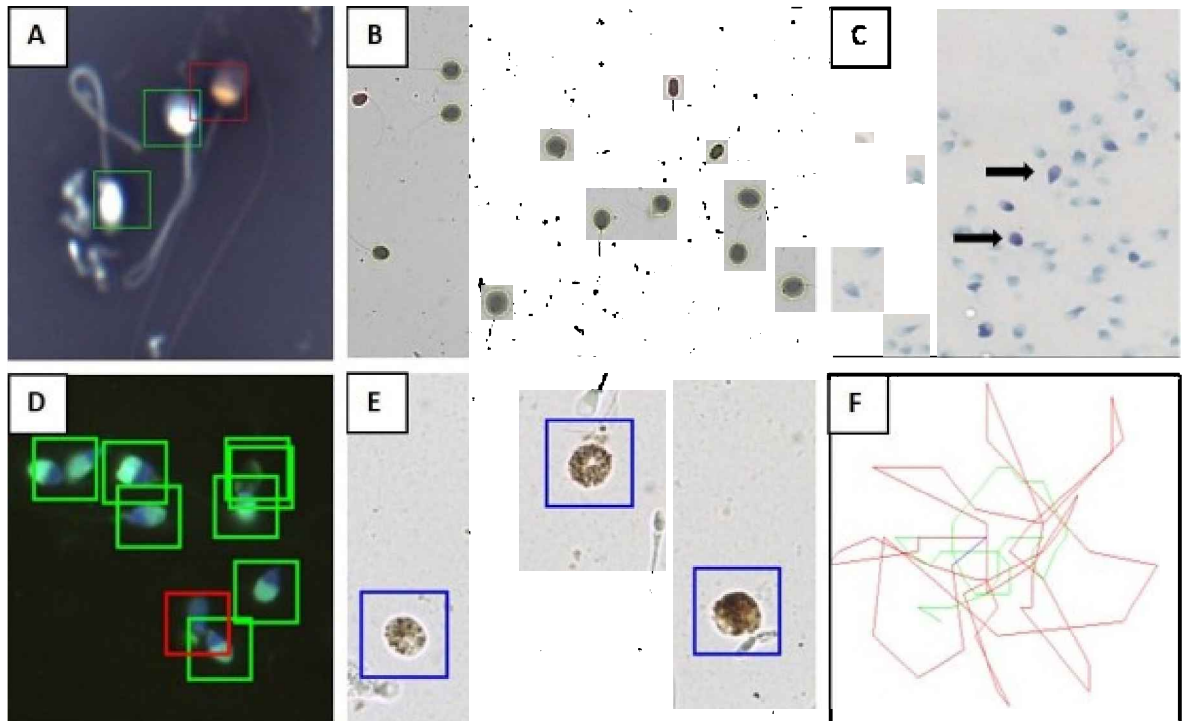
## Vitalidad

La vitalidad de los espermatozoides mide básicamente la integridad de la membrana de los espermatozoides, y esta evaluación, es especialmente importante si se encuentra que la motilidad total de los espermatozoides es inferior al 40% (1). Con los porcentajes de motilidad bajos registrados, es necesario determinar si la gran parte de los espermatozoides inmóviles están muertos (p. Ej., Debido a una patología del epidídimo) o simplemente no son móviles debido a defectos estructurales (p. Ej., Anomalías flagelares).

Dos métodos de rutina empleados para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos son la prueba supravital y la prueba de hinchazón hipoosmótica. Con la prueba supravital, se utiliza un método de tinción basado en eosina-nigrosina para identificar espermatozoides con membranas celulares comprometidas. Los espermatozoides muertos permitirán que entre el colorante de eosina y se tiña de rosa, mientras que la nigrosina se utiliza como tinción de fondo para proporcionar suficiente contraste, e identificar los espermatozoides blancos no teñidos que están vivos (Fig. 10A). Dado que los espermatozoides actúan como osmómetros, se hincharán cuando se coloquen en un medio hipotónico (36) si todavía tiene la membrana plasmática intacta. Se puede preparar una solución de hinchamiento por separado para realizar la prueba de hinchamiento hipoosmótico (1) o se puede utilizar una tinción hipotónica utilizada para la exclusión del tinte (por ejemplo, *BrightVit*) (**Figura 10A**).

Actualmente, la mayoría de los sistemas CASA solo pueden evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos / muertos después de preparar espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina. Al realizar una evaluación manual, se recomienda un objetivo de inmersión en aceite de 100x y una óptica de campo claro (1), mientras que un objetivo de 20x o 40x se puede utilizar para el análisis automático. Se debe analizar la vitalidad espermática de al menos 200 espermatozoides

por muestra (en diferentes partes del portaobjetos) y posteriormente se calculará el porcentaje de espermatozoides vivos. Es importante señalar que el porcentaje de espermatozoides vivos, debe ser igual o superior, al porcentaje de motilidad total; de lo contrario, existe una discrepancia con la evaluación de uno de estos dos parámetros.



**Figura 10:** Parámetros espermáticos adicionales evaluados mediante CASA (software SCA). A) Evaluación de la vitalidad mediante tinción BrightVit (eosina-nigrosina): bloque verde = cabeza blanca de espermatozoides vivos y bloque rojo = cabeza rosada de espermatozoides muertos. Hay que tener en cuenta que las colas de los espermatozoides vivos están hinchadas (hinchazón hipoosmótica) y los espermatozoides muertos tienen colas rectas. B) Evaluación de la fragmentación del ADN mediante la técnica Halosperm: espermatozoides oscuros pequeños en rojo = fragmentados y espermatozoides grandes en amarillo = no fragmentados. C) Valoración de la cromatina espermática mediante tinción con azul de toluidina: células oscuras (flechas) = cromatina menos compacta y células claras = espermatozoides con cromatina normal. D) Evaluación del estado del acrosoma mediante FITC-PNA y tinción de Hoechst: bloque verde = espermatozoides con acrosoma intacto (fluorescencia verde brillante) y bloque rojo = espermatozoides sin acrosoma (solo ver azul Hoechst). E) La presencia de leucocitos se indica mediante la detección de células/granulocitos positivos para peroxidasa (véanse las células teñidas de marrón rodeadas de bloques azules). F) patrón típico de natación en estrella de un espermatozoide hiperactivado: línea roja = VCL; línea verde = VAP. (ilustraciones en B y E con permiso de Microptic SL, Barcelona, España).

### Fragmentación del ADN

Existen numerosos ensayos de la fragmentación del ADN espermático (SDF por sus siglas en inglés), algunos de los cuales miden directa o indirectamente las roturas de la cadena de ADN, mientras que otros están asociados con la madurez o compactación del ADN (reemplazo de histonas por protaminas durante la espermatogénesis) (33). Muchos de estos ensayos requieren un equipo sofisticado para preparar y medir el nivel de SDF y algunos son bastante costosos de realizar (no se recomiendan para análisis de semen de rutina). Sin embargo, hay algunos de estos ensayos que requieren un protocolo de tinción bastante simple y solo microscopía de campo claro o de fluorescencia para la evaluación. Dos ensayos que se han incorporado a CASA son la prueba de dispersión de cromatina de esperma (SCD), también conocida como prueba de Halo, y la prueba de azul de toluidina (TB) (37,38). Para la prueba SCD / Halo, el software CASA detecta la presencia (sin rotura sustancial del ADN) o la ausencia (ADN fragmentado) de un halo alrededor

de la cabeza del esperma (Fig. 10B). Para la prueba de TB, la presencia de células oscuras (células metacromáticas / teñidas de púrpura) son indicativas de unión a residuos de fosfato de ADN (cromatina menos compacta) y su densidad óptica específica puede detectarse mediante el software CASA (Fig. 10C).

Debido al hecho de que diferentes ensayos de SDF miden diferentes aspectos de la fragmentación del ADN o las anomalías de la cromatina, los puntos de corte para cada ensayo (para identificar hombres con niveles de SDF demasiado altos) deben especificarse e incorporarse en el software CASA. Por ejemplo, un nivel de SDF del 30% medido con la prueba de SCD (y muchos otros ensayos de SDF) se considera alto y, mientras que los niveles de alrededor del 45% de células oscuras de TB son altamente predictivos de infertilidad (38). Los niveles altos de SDF se asocian con un desarrollo embrionario comprometido y tasas de fertilización más bajas en TRA (39). Cabe señalar que los resultados de la prueba de TB se correlacionan bien con los otros ensayos de SDF (40). El SDF de al menos 200-300 espermatozoides debe analizarse por muestra (dependiendo de la prueba específica) utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 100x y una óptica de campo claro. Posteriormente se calculará el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado (prueba SCD) o cromatina dañada (prueba TB).

### **Integridad del acrosoma**

La integridad de su estructura acrosómica es crucial para que los espermatozoides experimenten la reacción acrosomal y penetren las capas que rodean al ovocito antes de la fertilización. Si una muestra de semen contiene un alto porcentaje de espermatozoides sin un acrosoma intacto, esto podría ser indicativo de un problema con la formación del acrosoma durante la espermatogénesis, o la pérdida prematura del acrosoma antes de la eyaculación. La evaluación de la reacción acrosomal se cubre en la Sección 6.3.

La evaluación del acrosoma por CASA hace uso de la unión de lectinas marcadas con fluorescencia, como *Arachis hypogaea* (lectina de maní, FITC-PNA), a la membrana acrosomal externa de los espermatozoides (41). Usando esta lectina y microscopía de fluorescencia con un filtro FITC, los acrosomas aparecen de color verde brillante (Fig. 10D) y pueden detectarse con el software CASA. Sin embargo, los espermatozoides sin acrosomas son invisibles, pero deben contarse para calcular el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos. Por lo tanto, se debe usar una contratinción como Hoechst en combinación con un filtro Triband, para visualizar tanto la fluorescencia verde (acrosomas intactos) como la fluorescencia azul de las cabezas de los espermatozoides (acrosomas reaccionados). Los acrosomas de al menos 200 espermatozoides deben analizarse por muestra, utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 40x o 100x.

### **Recuento de leucocitos**

Aunque la aparición de leucocitos en un eyaculado es normal, la presencia de más de  $1 \times 10^6$  leucocitos / ml en el eyaculado se define como leucocitospermia (2) y es una indicación de infección en el tracto urogenital masculino. Numerosos estudios indican que la leucocitospermia contribuye de manera significativa a la infertilidad masculina, ya que esta afección conduce a una disminución de la motilidad de los espermatozoides, a un aumento del daño en el ADN de los espermatozoides y anomalías en la morfología de los espermatozoides (42).

Los granulocitos positivos a peroxidasa, que se originan principalmente en la próstata y las vesículas seminales, son la forma predominante de leucocitos en el semen y, por lo tanto, se puede emplear una tinción citoquímica que mida la actividad de la peroxidasa para detectar y calcular el recuento de leucocitos en un eyaculado. Las células positivas a la peroxidasa se tiñen de marrón y pueden detectarse mediante CASA, mientras que las células negativas a la peroxidasa no se tiñen (Fig. 10E). Las células redondas deben capturarse a lo largo de cuatro transectos en un portaobjetos utilizando un objetivo de 40x y una óptica de campo claro. El software CASA reconocerá la presencia de actividad de peroxidasa en las células redondas (cuando estén presentes) e informará el número de células positivas a peroxidasa por ml de eyaculado.

### **Evaluación de la funcionalidad de los espermatozoides por CASA**

Aunque un análisis de semen de rutina sigue siendo la piedra angular de una evaluación de la infertilidad, simplemente actúa como una herramienta para cuantificar la calidad del semen y no puede predecir la fertilidad per se ni proporcionar a los hombres una vía de fertilidad óptima (33,43). Se ha destacado la necesidad de pruebas funcionales de los espermatozoides más amplias, (44,45) para dilucidar los factores desconocidos que afectan la fertilidad masculina, y proporcionar tratamientos para la infertilidad, más individualizados, para los pacientes (43, 46). Los sistemas CASA modernos incluyen la evaluación de los aspectos funcionales de los espermatozoides relacionados con el tracto reproductivo femenino, como la penetración espermática en moco cervical, la hiperactivación y la reacción acrosomal.

### **Penetración espermática en moco cervical**

Aunque el cuello uterino es una de las primeras barreras que deben superar los espermatozoides eyaculados, la prueba de penetración espermática en moco cervical ya no se utiliza en la práctica clínica y, por lo tanto, se eliminó de la sexta edición del manual de la OMS. Se ha propuesto una técnica alternativa mediante la cual se identifica una subpoblación de espermatozoides con características específicas de nado que les permite penetrar a través del plasma seminal (47). En este caso, el plasma seminal es un sustituto del moco cervical y tiene la ventaja de que tiene propiedades de viscosidad similares a las del moco cervical. Este método también tiene sentido fisiológico porque una vez que los espermatozoides están en el tracto reproductivo femenino, tienen que nadar fuera de su propio plasma seminal y, por lo tanto, son desafiados por la viscosidad del plasma (33).

Para que el software CASA identifique la subpoblación de espermatozoides en una muestra de semen o preparación de esperma, que pueda superar los desafíos del plasma seminal (puede penetrar el moco), se utilizan valores de corte específicos para tres parámetros cinemáticos (**Tabla 3**). Si aún no forman parte de los algoritmos utilizados para clasificar los espermatozoides analizados, estos valores de corte para VAP, STR y ALH a menudo se pueden ingresar manualmente en una función de "clasificación" disponible como parte del software CASA. La penetración espermática en moco cervical se mide como parte de un análisis de motilidad CASA de rutina (consulte la Sección 4.3, Figura del análisis de motilidad que muestra los espermatozoides en caja de SMP) y se informa como el número de espermatozoides en el eyaculado / preparación que pasan los criterios especificados. El número ideal de espermatozoides que tienen capacidad de penetración espermática en moco cervical debe ser  $> 5 \times 10^6$  espermatozoides / eyaculado.

### **Hiperactivación**

La capacitación de los espermatozoides implica una serie de cambios bioquímicos y moleculares en la membrana plasmática de los espermatozoides, y el entorno intracelular que provocan una hiperactivación y seguidos por la reacción acrosomal. La hiperactivación de los espermatozoides se asocia con varias señales de  $Ca^{2+}$  y se caracteriza por un cambio de comportamiento en la forma de onda flagelar, que a menudo resulta en un patrón de nado en estrella (Fig. 10F). El patrón de nado vigoroso puede ayudar a los espermatozoides a migrar a través del entorno viscoelástico del tracto reproductivo femenino, a desprenderse del epitelio oviductal y permitir la penetración de las capas del ovocito (48,49). Se ha confirmado la importancia de la evaluación de la hiperactivación de los espermatozoides y su relación con la fertilidad (5).

La hiperactivación puede inducirse in vitro incubando espermatozoides en condiciones de capacitación, con o sin el uso de sustancias químicas específicas (por ejemplo, cafeína o progesterona) para estimular un aumento de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (34). Ciertos sistemas CASA están programados para medir rutinariamente la hiperactivación de los espermatozoides (Fig. 8) mediante el uso de puntos de corte específicos para VCL, LIN y ALH (o puede ingresarse en una función de "clasificación") (**Tabla 3**). Un parámetro alternativo para la magnitud de la amplitud del batido del flagelo durante la hiperactivación, que es independiente de ALH, es la medición de la dimensión fractal (D fractal) (5). En un informe de CASA, la



hiperactivación de los espermatozoides se expresa como el porcentaje de espermatozoides en el semen o en una preparación de esperma que posee características de hiperactivación. Se ha demostrado que las muestras de semen con al menos un 20% de hiperactivación se relacionan con espermatozoides de alta calidad con potencial de éxito de la fertilización (50,51).

### **Reacción acrosomal**

La reacción acrosomal (RA) y la hiperactivación están estrechamente relacionadas debido a que ambos parámetros funcionales de los espermatozoides, requieren un aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (34). Además de evaluar la integridad del acrosoma (ver Sección 5.3), también es importante evaluar si los espermatozoides capacitados tienen la competencia para realizar la RA. Se ha demostrado que el porcentaje de espermatozoides que sufren reacción acrosomal en el semen o en una preparación espermática, después de la inducción con un estímulo, se correlacionan significativamente con tasas de fertilización (52).

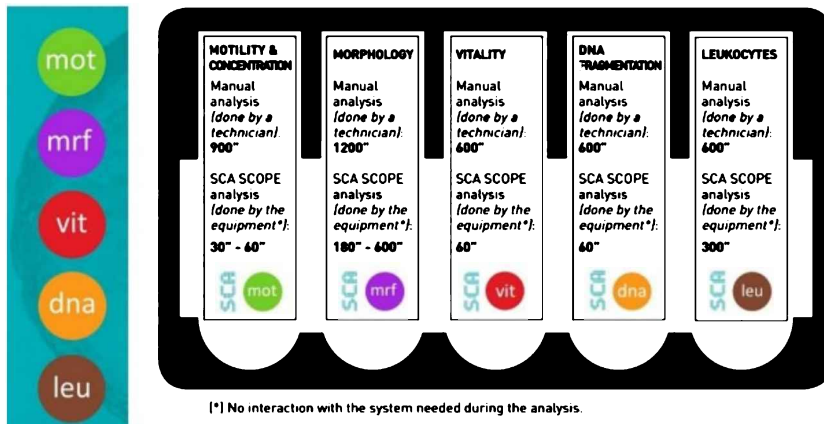
Dos sustancias químicas comunes utilizadas para la inducción de la RA incluyen 1-10  $\mu\text{mol} / \text{L}$  ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (A23187) o 2-10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de progesterona (1,34), conocida como la reacción acrosomal después de la provocación con ionóforo / progesterona (ARIC o ARPC por sus siglas en inglés). Después de seguir el procedimiento recomendado para la preparación y visualización de los espermatozoides que reaccionaron con el acrosoma (Sección 5.3) (1), la puntuación de ARIC debe incluir la puntuación tanto del porcentaje de prueba RA menos el porcentaje de control RA. La diferencia normal es del 15% RA y los valores por debajo del 10% son anormales, mientras que los valores entre el 10-15% sugieren infertilidad o función espermática comprometida (2).

### **Uso de CASA en el laboratorio de andrología moderno: perspectivas futuras y conclusión**

Los laboratorios de andrología y los centros de reproducción asistida en todo el mundo, ya utilizan ampliamente una amplia gama de sistemas CASA, y una revisión reciente de 2021 mostró una gran promesa usando CASA en el área clínica (53). Los artículos más importantes muestran una buena concordancia entre la motilidad y la concentración de espermatozoides de CASA y el análisis manual de la OMS. En general, la implementación de CASA con fines clínicos y de investigación ha aumentado drásticamente en los últimos diez años (34) y la tendencia parece continuar, como se refleja en las ventas de los sistemas CASA. También hay una mejora continua tanto en la tecnología informática como en el desarrollo de software con énfasis en la inteligencia artificial.

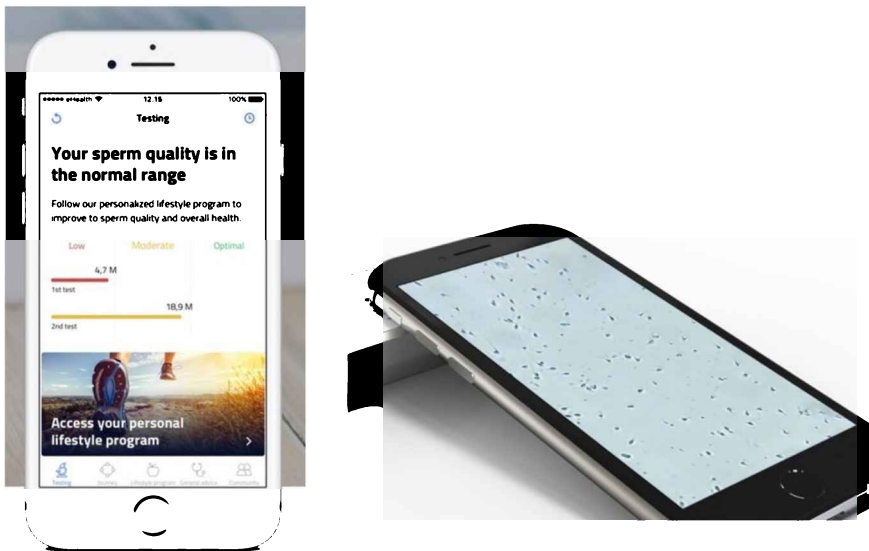
El SCA SCOPE (Microptic SL, Barcelona, España) como se ha discutido anteriormente, ya proporciona un prototipo para el futuro como un dispositivo médico CASA casi completamente automatizado. Actualmente, este dispositivo puede realizar un análisis completo, en quince minutos, de la concentración de espermatozoides, la motilidad de los espermatozoides, la morfología, la vitalidad, la fragmentación y el conteo de leucocitos de acuerdo con las normas de la sexta edición del manual de la OMS y sin interferencia humana (**Figura 11**). Es concebible que los sistemas más tradicionales como se indicó anteriormente, así como los sistemas más avanzados, como el SCA SCOPE, se utilizarán cada vez más en el entorno clínico. Es muy posible que en los próximos cinco años, los dispositivos médicos CASA completamente automatizados, se utilicen de forma rutinaria en los laboratorios de Andrología y los centros de reproducción asistida, y sean equivalentes a los sistemas que realizan análisis hematológicos completos completamente automatizados, que incluyen recuentos diferenciales complejos de glóbulos blancos.

## TIME COMPARISON



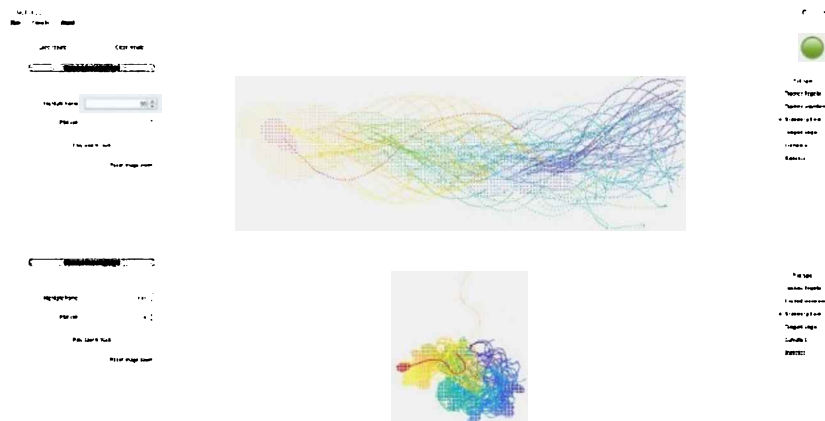
**Figura 11:** Comparación detallada en el tiempo, del análisis manual de semen en comparación con el SCA SCOPE completamente automatizado (ilustración con permiso de Microptic SL, Barcelona, España).

Además, los dispositivos de telefonía celular se han desarrollado para la detección del semen y para uso privado, y se basan en el software CASA tradicional que se puede descargar desde "la nube" (**Figura 12**). Las empresas que comercializan estos dispositivos también intentan relacionar los parámetros del semen con la salud general como un paso más progresivo.



**Figura 12:** Los teléfonos celulares con un accesorio simple para un soporte para análisis de semen (izquierda) ahora se pueden usar para analizar muestras de semen utilizando el software CASA tradicional (derecha) (ilustración con permiso de Microptic SL, Barcelona, España).

¿Qué depara el futuro? Cabe destacar dos novedades. El análisis de flagelos ahora se puede realizar casi de forma rutinaria a 169 fps utilizando el software de seguimiento de flagelos y espermatozoides (FAST) desarrollado por la Universidad de Birmingham y es muy posible que algunos de los parámetros flagelares recientemente documentados se relacionen con la funcionalidad de los espermatozoides y el éxito de la fertilización (54). La **Figura 13** es un ejemplo de dicho análisis y, en este caso, muestra la imagen de la onda flagelar de espermatozoides humanos hiperactivos.



**Figura 13:** Análisis flagelar de un espermatozoide humano. El video se capturó a 169 fps y posteriormente se analizó un archivo \*.avi mediante FAST. FAST calcula tanto los parámetros CASA tradicionales como toda una gama de nuevos parámetros flagelares.

En segundo lugar, los dispositivos de microscopía holográfica sin lentes, ya se han probado para determinar su capacidad para evaluar la motilidad de los espermatozoides, sobre la base de pequeñas diferencias de voltaje (Fig. 14). La ventaja de estos sistemas es que se trata de un equipo económico que puede caber en el bolsillo de una chaqueta. Además, el principio de holografía de la cámara CMOS combinado con la iluminación LED azul y roja desde dos ángulos, puede producir imágenes de seguimiento en 3D (55). Sin embargo, estos sistemas aún necesitan recorrer un largo camino en verificaciones, dejando solo el análisis de la morfología, fragmentación, vitalidad y otros parámetros de los espermatozoides.



**Figura 14:** Un microscopio holográfico en chip rentable compuesto por un sensor de imagen CMOS y un LED filtrado por un agujero de alfiler.

*Mensaje para llevar a casa: Actualmente, los sistemas CASA de buena reputación están llenando el mercado, y ciertamente pueden usarse clínicamente con confianza, a pesar del cierto escepticismo, siempre y cuando se tomen todas las medidas para la estandarización en términos de manejo del semen, siguiendo los protocolos correctos, controles de calidad semanales e interpretación.*

## Referencias

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Dearing CG, Kilburn S, Lindsay KS. Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Hum Fertil (Camb)*, 2014; 17(1):37–44. DOI: 10.3109/14647273.2013.865843.
4. Dearing C, Jayasena C, Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser (SCA) CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Hum Fertil (Camb)*, 2021; 24(3):208–218. DOI: 10.1080/14647273.2019.1610581.
5. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl*, 2015; 17(4):545–553. DOI: 10.4103/1008-682X.154312.
6. Van der Horst G, Samuels J. A new videographic method with computer analysis for measuring human and bull sperm velocity. *S Afr J Sci*, 1984;80:144.
7. Samuels JS, van der Horst G. Sperm motility analysis by means of frame lapse videography. *Arch Androl*, 1986; 17(2):151–155. DOI: 10.3109/01485018608990188.
8. Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res*, 1989; 22(4):443–469. DOI: 10.1002/mrd.1120220410.
9. Davis RO, Siemers RJ. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev*, 1995; 7:857–869. DOI: 10.1071/rd9950857.
10. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*, 1997; 3(5):403–439. DOI: 10.1093/humupd/3.5.403.
11. Sanchez, E. Artificial intelligence will not replace spermatologists. 2021 Blog. Microptic SL, 12 May 2021. <https://www.micropticsl.com/artificial-intelligence/>
12. Gallagher MT, Smith DJ, Kirkman-Brown JC. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reprod Fertil Dev*, 2018; 30(6):867-874. DOI: 10.1071/RD17420.
13. Rijnders S, Bolscher JG, McDonnell J, Vermeiden JP. Filling time of a lamellar capillary-filling semen analysis chamber is a rapid, precise, and accurate method to assess viscosity of seminal plasma. *J Androl*, 2007; 28(4):461-465. DOI: [10.2164/jandrol.106.002360](https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002360).
14. Andrade-Rocha F. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med*, 2005; 43(11):1203–1210. DOI: 10.1515/CCLM.2005.208.
15. Du Plessis SS, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013; 5:224–231. DOI: 10.2741/e610.
16. Harchegani AB, Rahmani H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Hyperviscous semen causes poor sperm quality and male infertility through induction of oxidative stress. *Curr Urol*, 2019; 13(1):1-6. DOI: 10.1159/000499302.
17. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Martin-Pont B, Hugues J, Wolf JP. World Health Organization grade ‘a’ motility and zona-binding test

- accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod*, 2005; 20(10):2769-75. DOI: 10.1093/humrep/dei118.
18. Björndahl L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl*, 2010; 12(1):33-35. DOI: 10.1038/aja.2008.50.
  19. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano, Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki, M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *Int J Androl* 2004, 27:63-68. DOI: [10.1111/j.0105-6263.2004.00437.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-6263.2004.00437.x).
  20. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y. A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998; 13(11):3103-3107. DOI: 10.1093/humrep/13.11.3103.
  21. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod*, 2003; 18(8):1643-1649. DOI 10.1093/humrep/deg306.
  22. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod*, 1998; 13(1):142-145.
  23. Bompard D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, Núñez de Murga M, Soler C. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reprod Fertil Dev* 2018; 30(6): 810-819. DOI: 10.1071/RD17551.
  24. Maree L. Standard semen analysis: computer-assisted semen analysis. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A (Eds), *Manual of sperm function testing in human assisted reproduction* (pp. 11-22). Cambridge: Cambridge University Press. 2021. DOI: 10.1017/9781108878715.005.
  25. Legendre A, Elmhiri G, Gloaguen C, Magneron V, Kereselidze D, Saci N, Elie C, Vaysset E, Benadjaoud MM, Tack K, Grison S, Souidi M. Multigenerational exposure to uranium changes morphometric parameters and global DNA methylation in rat sperm. *Comptes Rendus Biologies*, 2019; 42:175–185. DOI: 10.1016/j.crv.2019.07.002.
  26. Kochman D, Marchlewska K, Walczak-Jedrzejowska R, Stowikowska-Hilczer J, Kula K, du Plessis S, Blignaut R, van der Horst G. Comparison of manual and computer aided sperm morphology analysis. *Adv Androl Online*, 2016; 3:75.
  27. Van der Horst G, du Plessis SS, Maree L. Have We Conquered Sperm Morphology Analysis in Different Mammalian Species as Analysed by CASMA? In: Björndahl L, Flanagan J, Holmberg R, Kvist U (Eds) *XIIIth International Symposium on Spermatology*. Springer, Cham. 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-66292-9\_38.
  28. Maree L, Menkveld R, du Plessis SS, van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod*, 2010; 25(6): 1369-1382. DOI: 10.1093/humrep/deq075.
  29. Van der Horst G, Maree L. SpermBlue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechn Histochem*, 2009; 84(6):299-308. DOI: 10.3109/10520290902984274.
  30. Buffone MG, Doncel GF, Briggiler CIM, Vazquez-Levin MH, Calamera JC. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod*, 2004; 19:139-146. DOI: [10.1093/humrep/deh040](https://doi.org/10.1093/humrep/deh040).

31. Keyser S, van der Horst G, Maree L. Improved Sperm Function in Human Sperm Subpopulations: A Model for Studying Subfertility. In: Björndahl L., Flanagan J., Holmberg R., Kvist U. (eds) XIIIth International Symposium on Spermatology. Springer, Cham. 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-66292-9\_50.
32. Tomlinson MJ, Naeem A. CASA in the medical laboratory: CASA in diagnostic andrology and assisted conception. *Reprod Fertil Dev*, 2018; 30(6):850-859. DOI: 10.1071/RD17520.
33. Van der Horst G, du Plessis SS. Not just the marriage of Figaro: but the marriage of WHO/ESHRE semen analysis criteria with sperm functionality. *Adv Androl Online*, 2017; 4:6-21.
34. Van der Horst G, Maree L, du Plessis SS. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian sperm. *Reprod Fertil Dev*, 2018; 30(6):875-888. DOI: 10.1071/RD17468.
35. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AMM, Thomas CMG, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*, 2001; 16(6):1165-1171. DOI: 10.1093/humrep/16.6.1165.
36. Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 1993; 49(1):112-123. DOI: 10.1095/biolreprod49.1.112.
37. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, de Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*, 2005; 84(4):833-342. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089.
38. Tsarev I, Bungum M, Giwercman A, Erenpreisa J, Ebessen T, Ernst E, Erenpreiss J. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. *Human Reprod*, 2009; 24(7):1569–1574. DOI: 10.1093/humrep/dep068.
39. Cho CL, Agarwal A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: a systematic review. *Arab J Urol*, 2018; 16(1):21-34. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.002.
40. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*. 2004; 19(10):2277-2282. DOI: [10.1093/humrep/deh417](https://doi.org/10.1093/humrep/deh417).
41. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil*, 1987; 81(1):127-35. DOI: 10.1530/jrf.0.0810127.
42. Henkel R, Offor U, Fisher D. The role of infections and leukocytes in male infertility. *Andrologia*. 2020; 531:e13743. DOI: 10.1111/and.13743.
43. Esteves SC. Time has come to provide infertile men with an optimal pathway. *Int Braz J Urol*, 2021; 47(3):627-630. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2019.0362.1.
44. Barratt CLR, Björndahl L, de Jonge CJ, Lamb DJ, Martini FO, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, John BS, Sigman M, Sokol R, Tournaye H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*, 2017; 23(6):660-680. DOI: 10.1093/humupd/dmx021.

45. Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril*, 2014; 102(6):1528-1533. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.044.
46. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, Korrovits P, Laan M. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod*, 2017; 32(1):18-31. DOI: 10.1093/humrep/dew284.
47. Mortimer D, Mortimer, ST. Computer-aided sperm analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol*, 2013; 927:77-87. DOI: 10.1007/978-1-62703-038-0\_8
48. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reprod*, 2006; 12(1):23-37. DOI: 10.1093/humupd/dmi047.
49. Ardon F, Markello RD, Hu L, Deutsch ZI, Tung C, Wu M, Suarez SS. Dynamics of bovine sperm interaction with epithelium differ between oviductal isthmus and ampulla. *Biol Reprod*, 2016; 95(4):90. DOI: 10.1095/biolreprod.116.140632.
50. Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Arch. Androl*, 1984; 13(2-3):153-165. DOI: 10.3109/01485018408987514.
51. Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl.*, 1990; 11(3):195–203.
52. Xu F, Guo G, Zhu W, Fan L. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018; 16(1):81.
53. Finelli R, Leisegang K, Tumallapalli S, Henkel R, Agarwal A. The validity and reliability of computer assisted semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl Androl Urol*, 2021; 10(7):3069-3079. DOI: 10.21037/tau-21-276.
54. Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reprod*, 2019; 34(7):1173–1185. DOI: 10.1093/humrep/dez056.
55. Coppola G, Ferrara MA, Di Caprio G, Coppola G, Dale B. Unlabeled semen analysis by means of the holographic imaging. In Naydenova I, Nazarova D, Babeva T (Eds), *Holographic materials and optical systems*. IntechOpen. 2021. DOI: 10.5772/67552.

*Traducido, revisado y editado por el Biol. Gerardo Cerezo Parra.*

# TÉCNICAS CITOGENÉTICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

Isabel Ochando

Antonio Urbano

Jéssica Calvo

Joaquín Rueda

Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa, Departamento de Histología y Anatomía, Universidad Miguel Hernández, Cátedra de Biomedicina Reproductiva Vistahermosa, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España.

Autor correspondiente: Dra. Isabel Ochando Sánchez, Unidad de Genética Hospital HLA Vistahermosa. Avenida de Denia 76, 2ª Planta, 03016, Alicante. Teléfono: +34 672029313. Correo electrónico: [iochando@geneticavistahermosa.es](mailto:iochando@geneticavistahermosa.es)

## Cápsula

Descripción de los estudios citogenéticos que actualmente se recomienda realizar al varón infértil en la práctica clínica habitual.

## Introducción: Genética e infertilidad masculina

Miles de genes están implicados en la espermatogénesis, el desarrollo testicular y la regulación endocrina de la función testicular. La contribución genética a la infertilidad masculina es, por tanto, considerable, y la investigación básica de los últimos años ha descubierto una serie de genes que potencialmente podrían utilizarse en la práctica clínica. La investigación se ha visto impulsada por las nuevas tecnologías de análisis genético como los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS; del inglés, *genome-wide association study*) y la secuenciación del exoma y búsqueda de mutaciones en genes candidatos. Sin embargo, a pesar de los grandes avances que ha experimentado la genética clínica en estos últimos años, los análisis genéticos que se recomiendan actualmente en consultas de reproducción, son todavía relativamente pocos(1)(2) (Tabla 1) y las principales causas conocidas de esterilidad en el varón son alteraciones citogenéticas.

Utilizando estas pocas pruebas, se identifican anomalías genéticas en el 10-15% de las formas más graves de infertilidad masculina (azoospermia), estando la prevalencia de alteraciones genéticas inversamente relacionada con la concentración de espermatozoides(3).

Actualmente, se desconoce la causa de la infertilidad de una gran proporción de pacientes que acuden a consultas de reproducción (30%-60%). Una correcta aplicación de las pruebas genéticas disponibles en las diferentes formas de infertilidad masculina aumentará la probabilidad de llegar a un diagnóstico. El diagnóstico genético tiene un papel importante en la decisión clínica (elección del tratamiento, pronóstico), permite un adecuado asesoramiento genético, además de ser importante para la salud reproductiva de los pacientes y para la evaluación de riesgos para la descendencia. El presente tema se centrará en revisar los estudios citogenéticos que actualmente se recomiendan en el estudio del varón infértil y la tecnología que se emplea en dichos estudios.

**Tabla 1.** Pruebas citogenéticas recomendadas en el estudio del varón infértil.



PRUEBA GENÉTICA	INDICACIÓN	RECOMENDACIÓN
<b>Cariotipo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Infertilidad de origen idiopático</li> <li>✓ Hijo previo con alteración cromosómica</li> <li>✓ Abortos de repetición</li> <li>✓ Historia familiar de retraso mental/malformaciones</li> <li>✓ Varón: hipogonadismo, ginecomastia, criptorquidia, hipospadia, oligozoospermia/azoospermia no obstructiva</li> <li>✓ Todos los pacientes antes de un ciclo de reproducción asistida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ICSI + PGT-A/PGT-SR</li> <li>➤ Donación de gametos</li> <li>➤ Si gestación natural, diagnóstico prenatal</li> </ul>
<b>Microdeleciones del cromosoma Y (AZFa, b y c)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Azoospermia idiopática/Oligozoospermia &lt;5M/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ TESE-ICSI en pacientes con microdeleciones en AZFc (50-60% de recuperación de espermatozoides)</li> <li>➤ TESE-ICSI en pacientes con microdeleciones AZFb con marcador SY1192 positivo</li> <li>➤ Resto de microdeleciones, donación de gametos</li> </ul>
<b>FISH espermatozoides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alteración cromosómica constitucional</li> <li>✓ Oligozoospermia/teratozoospermia</li> <li>✓ Aborto de repetición</li> <li>✓ Fallo de implantación</li> <li>✓ Gestación previa con cromosomopatía y cariotipos normales en progenitores</li> <li>✓ Como factor pronóstico previo a FIV-ICSI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ICSI + PGT-A</li> </ul>

### Causas citogenéticas de infertilidad masculina

Las alteraciones citogenéticas que causan infertilidad masculina pueden ser constitucionales, como las alteraciones cromosómicas o las variaciones de número de copias (CNVs; del inglés, *copy number variations*), o alteraciones de la meiosis, limitadas a la línea germinal, que originan espermatozoides aneuploides.

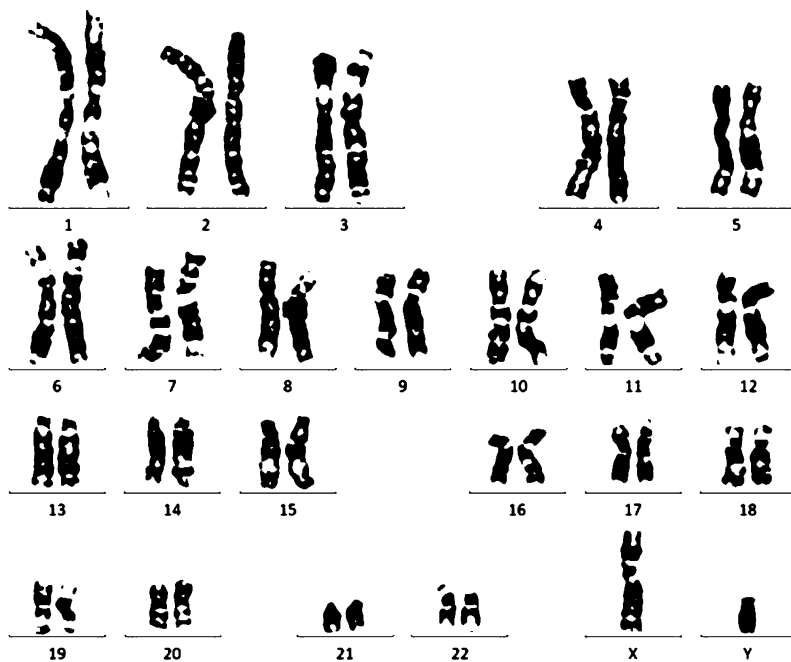
#### Alteraciones del cariotipo

El 15% de los varones con azoospermia no obstructiva y el 5% de los que tienen oligozoospermia severa son portadores de anomalías cromosómicas, siendo la más frecuente la trisomía 47,XXY (síndrome de Klinefelter) en varones azoospermicos y las anomalías estructurales en los oligozoospermicos(4)(5). A pesar de que las alteraciones cromosómicas son más frecuentes en varones con bajo recuento espermático, razón por la que las sociedades científicas recomiendan realizar el estudio de cariotipo a varones con claros signos clínicos de insuficiencia testicular primaria(1)(2), también los pacientes con oligozoospermia moderada o incluso normozoospermia pueden ser portadores de anomalías cromosómicas. Por ello, el estudio de cariotipo se debe recomendar a todos los varones que van a someterse a un ciclo de reproducción asistida(6)(7).

Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas, cuando se ve alterado el número de cromosomas, o estructurales, cuando se altera su estructura, y pueden implicar a los cromosomas sexuales o a los autosomas. Ambas pueden afectar a todas las células del individuo o ser en mosaico, cuando son originadas por una no disyunción en una división postcigótica temprana, con dos o más complementos cromosómicos diferentes.

Las alteraciones estructurales pueden ser equilibradas (sin ganancia ni pérdida de material cromosómico) o desequilibradas (con ganancia o pérdida de material cromosómico).

Todas estas alteraciones se diagnostican mediante el estudio del cariotipo en sangre periférica (Fig. 1), que se describe más adelante (apartado 3.1), que permite la detección de mosaicos y de alteraciones tanto equilibradas como desequilibradas, con una resolución de hasta 8 Mb (Fig. 2). El estudio mediante array de hibridación genómica comparada (CGH-array; del inglés, *comparative genomic hybridization*) nos permite la detección de CNVs con una resolución de hasta 100 Kb, pero no permite la detección de alteraciones equilibradas ni de mosaicos inferiores al 30%, por lo que no resulta útil para la detección de las alteraciones que más frecuentemente se relacionan con infertilidad en el varón.

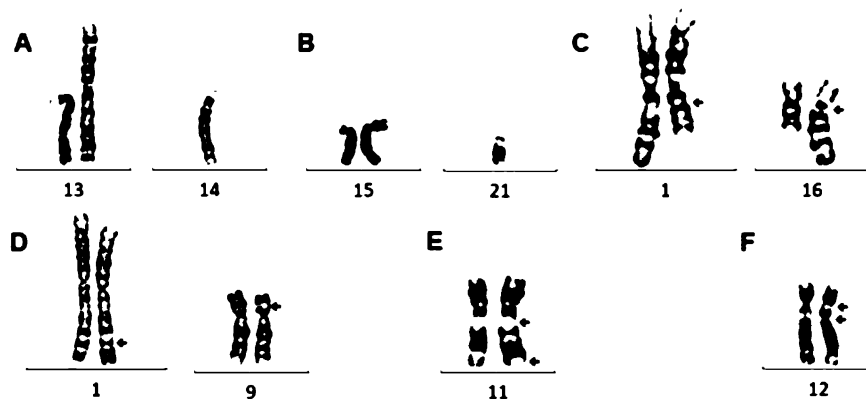


**Figura 1.** Cariotipo de un varón cromosómicamente normal, con fórmula cromosómica 46,XY, teñido con bandas G y con una resolución aproximada de 550 bandas.

### *Aneuploidías de los cromosomas sexuales*

Las aneuploidías se definen por un número anormal de cromosomas con respecto al estado euploide (46,XY o 46,XX). Las aneuploidías más frecuentes detectadas en los varones infértiles implican a los cromosomas sexuales, como el síndrome de Klinefelter (al menos un cromosoma X adicional), la trisomía 47,XYY, el síndrome masculino 46,XX o síndrome De la Chapelle y la disgenesia gonadal mixta (45,X/46,XY).

El síndrome de Klinefelter está presente en 1/600 varones en población general. Representa la anomalía del cariotipo más frecuente en varones infértiles, con una prevalencia del 10-12% en varones con azoospermia no obstructiva, y del 0,5-1,0% en varones con oligozoospermia severa. La característica genética es el cromosoma X adicional: aproximadamente el 80%-90% de los pacientes con síndrome de Klinefelter tienen un cariotipo 47,XXY, mientras que el 10%-20% restante incluye mosaicismos de dos líneas genéticas diferentes, como 47,XXY/46,XY. El síndrome de Klinefelter se debe a la no disyunción de los cromosomas X durante la meiosis I o II materna, y menos frecuentemente (3%) a la no disyunción durante la embriogénesis temprana en el óvulo fecundado.



**Figura 2.** Ejemplos de alteraciones cromosómicas equilibradas. (A) Translocación robertsoniana en la que se fusionan los brazos largos de los cromosomas 13 y 14, 45,XX,der(13;14)(q10;q10). (B) Translocación robertsoniana en la que se fusionan los brazos largos de los cromosomas 15 y 21, 45,XX,der(15;21)(q10;q10). (C) Translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 1 y 16, 46,XY,t(1;16)(q21;q11.2). (D) Translocación recíproca entre el brazo largo del cromosoma 1 y el brazo corto del cromosoma 9, 46,XX,t(1;9)(q42;p13). (E) Inversión paracéntrica en el brazo largo del cromosoma 11, 46,XX,inv(11)(q13.2q25). (F) Inversión pericéntrica en el cromosoma 12, 46,XY,inv(12)(p11.2q14). Se marcan con flechas los puntos de ruptura en los reordenamientos.

Fenotípicamente, los pacientes con síndrome de Klinefelter muestran una variabilidad sustancial en la expresión y la gravedad. En el testículo se produce hialinización de todos o la mayor parte de los tubos seminíferos, lo que origina azoospermia (90% de los pacientes), criptozoospermia u oligozoospermia severa. Se suele asociar hipoandrogenismo. La posibilidad de recuperar espermatozoides mediante la extracción testicular de espermatozoides (TESE; del inglés, *testicular sperm extraction*) es bastante buena (45-50%)(8). Dada la alta incidencia de alteraciones cromosómicas presente en los espermatozoides de varones con síndrome de Klinefelter(9) se recomienda estudio genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A; del inglés, *preimplantation genetic testing for aneuploidy*) en estos casos. Por otro lado, el diagnóstico temprano de estos varones es importante para poder realizar criopreservación del eyaculado o de espermatozoides testiculares, pues la hialinización testicular es progresiva.

El cariotipo 47,YYY es la segunda aneuploidía más frecuente de los cromosomas sexuales en varones infértiles, con una incidencia del 0,1%. Esta alteración se origina por una no disyunción en la meiosis II durante la espermatogénesis (85%) o por un error postcigótico (15%).

El diagnóstico de esta alteración es frecuentemente un hallazgo casual dado que estos pacientes son fenotípicamente normales. La fertilidad es variable, con recuentos de espermatozoides que van desde la azoospermia hasta la normozoospermia, y los niveles de testosterona son generalmente normales. Aunque algunos estudios por hibridación in situ fluorescente (FISH; del inglés, *fluorescence in situ hybridization*) mostraron un aumento de aneuploidías en espermatozoides, no se ha documentado un mayor riesgo de aneuploidías en la descendencia.

El síndrome de varón XX, también conocido como síndrome de De la Chapelle, es una alteración de la diferenciación sexual que afecta a 1/20.000 varones. El fenotipo más frecuente es el de un varón normal, con testículos pequeños, pero también puede presentarse como un varón con genitales ambiguos e incluso feminización. De forma constante, cursa con atrofia testicular y azoospermia con infertilidad; en ocasiones, asocia ginecomastia, obesidad o fallo de descenso testicular (se asemejan a los pacientes Klinefelter). La posibilidad de recuperación de espermatozoides mediante TESE es prácticamente nula, por lo que no se recomienda(10).

Los varones con disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY pueden presentar al nacer genitales ambiguos o desarrollarse como varones fenotípicamente normales, con insuficiencia gonadal y/o

baja estatura. El fenotipo es variable y las gónadas pueden desarrollarse en forma de testículos o vetas indiferenciadas y pueden estar localizadas en el escroto, intraabdominales o a lo largo de la vía de descenso en el canal inguinal. Los individuos con testículos escrotales bilaterales suelen presentarse como varones de baja estatura y con insuficiencia gonadal, azoospermia y muy pocas posibilidades de recuperar espermatozoides por TESE(11). Aproximadamente la mitad de ellos tienen hipogonadismo primario con necesidad de sustitución de testosterona. Este síndrome puede presentar también malformaciones cardíacas y renales, gonadoblastoma y tumores de células germinales.

#### *Alteraciones estructurales del cromosoma Y*

Las alteraciones estructurales del cromosoma Y, como deleciones, anillos, isocromosomas, inversiones y translocaciones, también se encuentran entre las causas de infertilidad en el varón. Entre ellas, las alteraciones más frecuentes son las translocaciones entre el cromosoma Y y los cromosomas autosómicos. La frecuencia de las alteraciones del cromosoma Y en la población general es del 0,02%, pero la frecuencia aumenta al 0,3% en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos graves. Las deleciones de regiones del cromosoma Y que contienen genes necesarios para la espermatogénesis pueden ser detectadas mediante el cariotipo cuando se incluye la mayor parte del brazo largo (Yq), o pueden ser microdeleciones solo visibles con técnicas moleculares, y que son la causa de hasta el 10% de los casos de azoospermia no obstructiva. Estos casos de microdeleciones en el cromosoma Y se expondrán más adelante (apartado 2.2).

#### *Alteraciones estructurales de los autosomas*

Las alteraciones estructurales autosómicas detectadas mediante el estudio del cariotipo incluyen tanto alteraciones equilibradas como desequilibradas, como translocaciones, inversiones, anillos, isocromosomas, deleciones o duplicaciones parciales (siempre que sean mayores de 8 Mb).

Las alteraciones estructurales de los autosomas más frecuentes son las translocaciones recíprocas (intercambio de fragmentos cromosómicos entre dos o más cromosomas) y las robertsonianas (fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos con pérdida de los brazos cortos), que son 10 veces más frecuentes en varones infértiles(3)(6). La translocaciones robertsonianas tienen una incidencia de 0,9% en varones infértiles(7).

Los varones portadores de translocaciones recíprocas o robertsonianas son fenotípicamente normales, pero tienen una mayor tasa de espermatozoides con alteraciones cromosómicas desequilibradas y aneuploidías de otros cromosomas no implicados en el reordenamiento, debidas a errores meióticos (lo que se denomina efecto intercromosómico). Por ello, todos los varones portadores de cualquier alteración cromosómica tienen que recibir asesoramiento genético y se les debe recomendar la selección embrionaria mediante estudio genético preimplantacional de reordenamientos estructurales (PGT-SR; del inglés, *preimplantation genetic testing for structural chromosomal rearrangements*).

#### **Microdeleciones del cromosoma Y**

La incidencia de microdeleciones en las regiones de azoospermia situadas en el brazo largo del cromosoma Y (AZF; del inglés, *azoospermia factors*) es de 1:4000 en población general, y están presentes en un 5-10% de pacientes con oligozoospermia severa y en un 10-15% de pacientes con azoospermia no obstructiva idiopática(12). La mayoría de las deleciones son *de novo* y es probable que surjan durante la meiosis de los gametos del padre del paciente. Se han descrito tres regiones, AZFa, b y c, localizadas de la región proximal a la distal de Yq. Las seis formas clásicas de deleciones de AZF y su correspondiente fenotipo, en orden de gravedad decreciente incluyen: AZFabc (síndrome de sólo células de Sertoli), AZFa (síndrome de sólo células de Sertoli), AZFbc (síndrome de sólo células de Sertoli/detención de la maduración), AZFb (detención de la maduración), AZFc (que va de la oligozoospermia grave a azoospermia), y AZFc parcial (desde la espermatogénesis normal hasta la azoospermia)(13).

La microdelección más frecuente afecta a la región AZFc (alrededor del 80% de las deleciones). Los pacientes portadores de esta deleción, pueden presentar diferentes grados de alteraciones espermatogénicas, pero, hasta el 70% presentan espermatozoides en el eyaculado, normalmente menos de 2 millones de espermatozoides por mililitro. En los pacientes con azoospermia y deleciones de AZFc, mediante TESE pueden recuperarse espermatozoides del testículo en 50%-60% de los casos(14). Las microdeleciones en AZFc se asocian a mosaicismo de

cromosomas sexuales (45,X/46,XY), por lo que se recomienda el estudio de cariotipo a todos los pacientes portadores de deleciones AZFc, ya que el mosaicismo se considera un predictor negativo del éxito de la recuperación de esperma y se asocia a un mayor riesgo de tener hijos con monosomía X y mayor tasa de abortos(15). La disminución en la producción de espermatozoides es progresiva en pacientes portadores de deleciones AZFc, por lo que se debe recomendar la criopreservación.

Las deleciones completas de AZFa son infrecuentes (3%). Tienen el peor pronóstico, con azoospermia en todos los pacientes. La histología demuestra típicamente el síndrome de sólo células de Sertoli, con prácticamente ninguna posibilidad de encontrar espermatozoides mediante TESE.

Las deleciones de AZFb representan el 15% de las microdeleciones Yq. Las deleciones completas AZFb dan lugar a azoospermia y al síndrome de sólo células de Sertoli o detención temprana de la maduración de la espermatogénesis. Los pacientes portadores de la deleción AZFb pero que mantienen el marcador distal sY1192, presentan una espermatogénesis residual y una maduración completa. Por ello, desde el punto de vista clínico, se recomienda estudiar este marcador en pacientes portadores de la deleción AZFb, ya que, si está presente, se puede intentar la obtención de espermatozoides mediante TESE(14).

La deleción AZFbc, que combina estas dos regiones solapantes, constituye el 13% de las microdeleciones Yq. En estos casos no se recomienda intentar la obtención espermática mediante TESE.

En conclusión, el cribado de microdeleciones AZF no sólo es útil para el diagnóstico, sino que también es importante para el pronóstico del TESE. Las sociedades científicas recomiendan realizar el cribado de microdeleciones AZF a todos los pacientes con oligozoospermia severa (<5 millones) o azoospermia. Este estudio de microdeleciones del cromosoma Y se realiza mediante técnicas moleculares de forma estandarizada, según las directrices de la EAA/EMQN(16).

A los pacientes que puedan tener descendencia con gametos propios se les debe proporcionar asesoramiento genético e informarles de que todos sus hijos varones heredarán la deleción y, por tanto, presentarán azoospermia/oligozoospermia.

### **Variaciones submicroscópicas de número de copia**

La aparición de nuevas herramientas de diagnóstico genético, como los CGH-array y la secuenciación del exoma, ha permitido la identificación de CNVs (deleciones y duplicaciones submicroscópicas) causantes de infertilidad masculina, tanto en los cromosomas sexuales como en los autosomas.

Se han descrito deleciones en la citobanda 9p24.3, que contiene el gen *DMRT1*, esencial para la diferenciación de las células tanto germinales como somáticas del testículo, en pacientes con disgenesia gonadal(17) y azoospermia no obstructiva(18). Estas deleciones presentan una penetrancia incompleta, ya que también se han detectado en varones con espermatogénesis normal, por lo que no está claro si estas deleciones en heterocigosis son suficientes para causar el fallo en la espermatogénesis o la disgenesia gonadal.

Otra CNV que se ha asociado a infertilidad masculina es la duplicación 19p13.3, presente solo en pacientes con síndrome de sólo células de Sertoli o con oligozoospermia severa, pero no en población control(19), pero son necesarios más estudios para considerar esta duplicación como un marcador de esterilidad masculina.

En cuanto a los cromosomas sexuales, se han identificado tres CNVs en el brazo largo del cromosoma X: CNV64 (Xq27.3), CNV67 (Xq28) y CNV69 (Xq28)(20) asociadas a infertilidad masculina en población caucásica. Sin embargo, estudios realizados en población china, no han encontrado relación entre estas CNVs y la infertilidad masculina(21).

En el cromosoma Y se ha identificado una deleción diferente a las deleciones clásicas, descritas anteriormente, la deleción gr/gr, localizada en la región AZFc, que elimina dos de las cuatro copias del gen DAZ. Esta deleción aumenta 2-4 veces el riesgo de oligozoospermia y está presente en el 3-4% de varones con oligozoospermia (frente al 0,4-1,4% en varones con normozoospermia). Esta deleción, igual que las anteriormente mencionadas en el cromosoma X, se relacionan con infertilidad en población caucásica pero no en población china ni japonesa.

Por todo ello, actualmente no se recomienda el estudio rutinario de CNVs en pacientes infértiles.

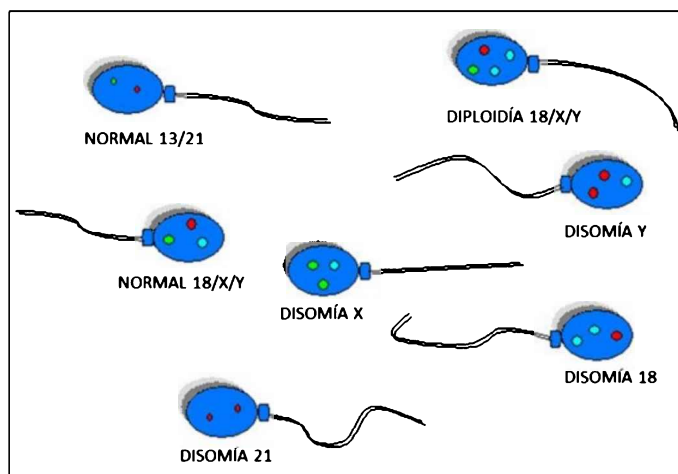
### **Alteraciones de la meiosis**

La aneuploidía embrionaria es la causa más frecuente de los fallos de la fecundación *in vitro* (FIV); ello puede ser debido a alteraciones de la meiosis (ovogénesis y espermatogénesis) o bien a

errores en la mitosis de las primeras divisiones tras formarse el cigoto. Las alteraciones meióticas se producen por fallos en los controles moleculares del ciclo celular. El nivel de alteración meiótica es diferente según el sexo, como consecuencia de las diferencias biológicas del proceso: en la ovogénesis, todos los ovocitos primarios están presentes en el nacimiento, detenidos en la primera división meiótica (donde se mantienen durante años), mientras que los espermatozoides son células “jóvenes” durante toda la vida, puesto que la espermatogénesis es continua a partir de la pubertad y el proceso de meiosis tiene una duración de unos dos meses.

Es bien conocido el efecto de la edad de la mujer (y, por tanto, de sus ovocitos) sobre la reserva ovárica y la calidad ovocitaria. A los 38 años, más de la mitad de los ovocitos presentan aneuploidías para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22(22), lo que permite suponer que la tasa de aneuploidías de todos los cromosomas en los ovocitos es considerablemente superior a las cifras indicadas y, a partir de los 35 años, el número de ovocitos euploides es escaso. Por motivos evidentes, no es posible el estudio de la ploidía en los ovocitos a emplear en una técnica de FIV.

En cuanto a los espermatozoides, conocemos que cifras de aneuploidía por debajo del 7% no tienen efecto sobre la fertilidad y se consideran cifras “normales” de errores meióticos(23). Desde 1995, cuando se publicó el primer artículo sobre la estructura cromosómica de los espermatozoides(24), un importante número de estudios han puesto de manifiesto que en la población infértil hay un número significativo de pacientes, incluso con normoozoospermia, que tienen anomalías cromosómicas espermáticas y éstas se pueden estudiar mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)(25,26) (Fig. 3 y 4). Un aumento en el porcentaje de aneuploidías espermáticas se relaciona directamente con un mayor riesgo de anomalías cromosómicas en el embrión y, por consiguiente, con disminución en las tasas de implantación y gestación, e incremento de las tasas de aborto. Por ello, el estudio mediante FISH en espermatozoides es una herramienta de valor pronóstico para evaluar las posibilidades reproductivas en parejas infértiles(26,27).

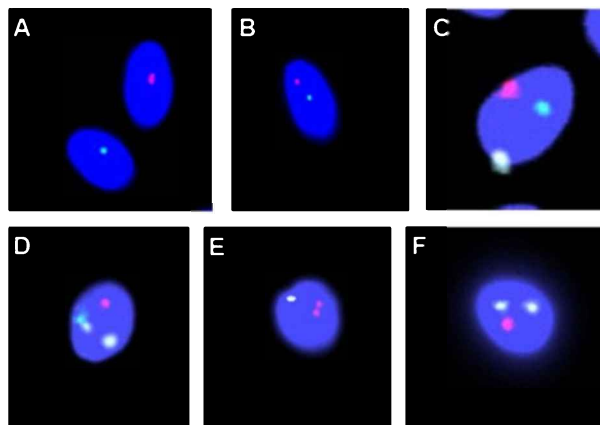


**Figura. 3.** Representación esquemática de diferentes dotaciones cromosómicas presentes en espermatozoides teñidos mediante la técnica FISH.

Por vez primera, la reciente edición del Manual de Laboratorio de la OMS para el estudio de semen, cita entre las técnicas especiales de estudio, la FISH de espermatozoides para conocer la frecuencia de anomalías cromosómicas(28), indicando que el resultado se debe expresar como porcentaje de espermatozoides con disomía o diploidía.

La tecnología de FISH de espermatozoides, cuyo procedimiento se detalla más adelante (apartado 3.2), es relativamente sencilla pero laboriosa, que precisa de experiencia en el análisis cromosómico interfásico, la aplicación de criterios de valoración estrictos y el empleo de una población control propia de cada laboratorio a partir de individuos con fertilidad probada. A este respecto, el Manual de la OMS cita dos estudios que pudieran servir de referencia para los estudios controles(28).

Entre los varones infértiles, podemos distinguir dos grupos, aquellos que muestran un cariotipo alterado y los que presentan cariotipo normal.



**Figura. 4.** Espermatozoides teñidos mediante la técnica FISH. Se ha utilizado una contratinción de DAPI que delimita el núcleo. (A) Espermatozoides con un cromosoma X (sonda verde) y un cromosoma Y (sonda roja). (B) Espermatozoide con un cromosoma 13 (sonda verde) y un cromosoma 21 (sonda roja). (C) Espermatozoide con una disomía X/Y y un cromosoma 18 (sonda aqua). (D) Espermatozoide con una diploidía 18/X/Y. (E) Espermatozoide con una disomía Y y un cromosoma 18. (F) Espermatozoide con una disomía 18 y un cromosoma Y.

#### *FISH de espermatozoides en varones con cariotipo alterado*

Los varones que presenta alteraciones numéricas en su cariotipo (47,XXX, 47,XYY) y, sobre todo, estructurales equilibradas (translocaciones recíprocas, translocaciones robertsonianas, inversiones) van a tener: 1) meiosis alterada, con bloqueo meiótico, que ocasionará recuento espermático bajo; 2) espermatozoides desequilibrados por alteraciones en el proceso de segregación; y 3) espermatozoides aneuploides por efecto inter cromosómico(29,30). En los varones con translocaciones no es necesario realizar estudio de segregación puesto que conocemos, por la bibliografía, que el 40-60% estarán alterados. Respecto a las inversiones, si éstas afectan a más del 40% de la longitud del cromosoma, también van a presentar alteraciones espermáticas, por lo que tampoco es necesario el estudio de segregación en estos casos, pues asumimos que va a estar alterado. Respecto al efecto inter cromosómico, el 40-50% de los pacientes con translocaciones e inversiones cromosómicas grandes, van a tener un efecto inter cromosómico positivo que afecta, casi exclusivamente a los cromosomas sexuales(30), que serían los que hay que estudiar. Una FISH de espermatozoides en estos pacientes permite identificar individuos en riesgo.

Por tanto, en individuos con translocaciones, e inversiones cromosómicas mayores del 40%, debe aconsejarse la realización de selección embrionaria mediante PGT-SR y realizar FISH de espermatozoides para los cromosomas X,Y,21 para comprobar el efecto inter cromosómico. Si éste es positivo, realizar, además de PGT-SR, PGT-A.

#### *FISH en espermatozoides en varones con cariotipo normal*

Es un hecho conocido la existencia de un número elevado de individuos infértiles con cariotipo normal y espermatozoides aneuploides(25). La causa es la presencia de mutaciones en genes implicados en la meiosis (mecanismos de sinapsis, recombinación, reparación y segregación), que pueden originar un bloqueo meiótico, con bajo recuento espermático y/o incremento en el porcentaje de alteraciones cromosómicas en los espermatozoides.

Respecto a los cromosomas a estudiar, no es factible, por el alto coste, el estudio de todos los cromosomas. En todo caso, hay que poner de manifiesto, que en las más de 50 publicaciones que existen al respecto desde 1995, en la mayoría de ellas hay alteraciones del par XY que no se

acompañan de incrementos significativos de autosomas, excepto el cromosoma 21, por lo que es suficiente estudiar los cromosomas X, Y, 21(31).

La mayoría de incrementos reportados en la literatura, son bajos o moderados (0,23%-14%), con una media de 1,41%. Por tanto, aunque sean cifras bajas, indican una alteración de la espermatogénesis y riesgo incrementado de tener embriones aneuploides. La interpretación del estudio debe ser cualitativa.

Las indicaciones para realizar FISH de espermatozoides en individuos infértiles con cariotipo normal son las siguientes: oligozoospermia, teratozoospermia, fallo de implantación, aborto de repetición, gestación anterior con cromosomopatía y cariotipos de ambos progenitores normales, y se puede considerar realizarlo previo a ICSI por su utilidad como pronóstico. Los cromosomas a estudiar son X, Y, 21, lo que nos permitirá identificar individuos en riesgo y se debe aconsejar la realización de selección embrionaria mediante PGT-A en ciclos en los que se utilicen gametos de estos varones (Tabla 1).

## **Técnicas citogenéticas empleadas en el diagnóstico del varón infértil**

### **Cariotipo en sangre periférica**

El estudio de cariotipo se lleva a cabo en nuestro laboratorio mediante un protocolo estándar de obtención de prometafases y tinción de bandas G, que se describe a continuación. Cada laboratorio debe estandarizar los tiempos para optimizar el resultado, ya que las condiciones ambientales influyen enormemente en la calidad de las extensiones.

#### **Cultivo celular:**

Es necesario trabajar en todo momento en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar vertical). Antes de empezar, se debe esterilizar la superficie encendiendo la luz UV durante un mínimo de 15 minutos y todo el material que se introduzca en la cabina debe ser estéril. La muestra de partida es sangre periférica en heparina de litio. Añadimos 0,5 ml de sangre en un tubo con 5 ml de medio de cultivo para linfocitos (Chromosome P, Euroclone). Se agita con vórtex y se incuba durante 72h en una estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

El día anterior al sacrificio (12-16h) se añade 0,1 ml de Synchronet solución A (Euroclone) y el día del sacrificio, 4h antes, se añade 0,1 ml de la solución B. La sincronización del ciclo celular de los linfocitos nos permite obtener un gran número de prometafases y una alta resolución de bandas (superior a 550 bandas).

#### **Parada de la división celular:**

Se añade al cultivo 0,1 ml de Colcemid (10 µg/ml en PBS, Euroclone), un antimitótico que despolimeriza los microtúbulos del huso mitótico, deteniendo la división celular. Se deja actuar el Colcemid durante 1h a 37°C.

#### **Sacrificio celular:**

Se centrifuga el cultivo durante 6 min a 1500rpm. Tras el cultivo celular, las células son sometidas a un choque hipotónico con cloruro potásico (KCl 0,56%) durante 15 min a 37°C. Se recomienda que la solución hipotónica esté previamente calentada a 37°C. Es importante resuspender el pellet celular antes de añadir el KCl, que en un inicio se añadirá gota a gota. Este paso nos permite que los linfocitos aumenten su volumen para que posteriormente se lisen con mayor facilidad.

A continuación, se lleva a cabo la fijación con solución de carnoy (3 metanol:1 ácido acético glacial). Para ello, se realizan tres ciclos de centrifugación (6 min a 1500rpm), retirada del sobrenadante, adición del carnoy y resuspensión del pellet. Los lavados con solución de carnoy lisan los hematíes y permiten la rotura de la membrana plasmática durante la extensión.

#### **Extensión, envejecimiento y tinción de bandas G:**

Las extensiones deben realizarse con una dilución ajustada y condiciones de humedad y temperatura adecuadas (20-21°C, 40-50% HR) para conseguir que los cromosomas queden separados y sin restos citoplasmáticos. Si los cromosomas están excesivamente juntos y con restos de citoplasma, la extensión se puede realizar cerca de un baño de agua a 37°C, para aumentar la humedad.

El envejecimiento (paso necesario para obtener las bandas cromosómicas) se puede realizar dejando las extensiones durante 24-48h en una estufa a 37°C o durante 30min a 100°C.



Para la tinción de las bandas G, se deshidratan las extensiones en una serie de etanol (50-70-100%, 2 min en cada uno). Se realiza un tratamiento con tripsina (solución B en DBPS, diluida 0,05% en buffer GURR) durante un tiempo variable (previamente hay que ajustarlo, ya que puede variar entre 30-60seg), se lava con buffer GURR y se tiñe con una solución de Leishman (se prepara una solución madre en etanol 100%, al 0,15% y posteriormente, se diluye 1 Leishman:3 buffer GURR) durante 2 min. Se lava en buffer GURR.

Se estudian 20 promefases con un objetivo de inmersión 100X.

## **FISH en espermatozoides**

Esta técnica utiliza sondas comerciales marcadas con fluorescencia (*AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit*, CEP 18/X/Y / LSI 13/21, Vysis), que hibridan con regiones específicas de 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y) con el fin de poder contar los cromosomas de un número de espermatozoides suficiente para poder detectar alteraciones en la meiosis (diploidías o disomías). Previamente, cada laboratorio debe calcular los porcentajes de diploidías y disomías en una población de varones con fertilidad probada para poder utilizarlos como valores de normalidad, por encima de los cuales, se considerará que la meiosis está alterada.

### **Lavado y fijación de la muestra:**

Tiene como función el lavado de los espermatozoides y la preservación del ADN. Se parte de 1ml de semen, que se lava con PBS mediante 3 ciclos de centrifugación (5 min a 1500rpm), eliminación del pellet y resuspensión en PBS. Posteriormente, se resuspende el pellet con solución de carnoy frío. Se extiende la suspensión sobre dos portaobjetos, a uno de ellos se le añadirá las sondas que hibridarán con los cromosomas 13 y 21 (específicas de locus), y al otro, las sondas 18, X e Y (centroméricas), hasta alcanzar la concentración deseada, observando con un microscopio de contraste de fases.

### **Pretratamiento:**

Tiene como función aumentar la accesibilidad de la sonda al ADN de la muestra. Dado que el ADN de los espermatozoides está muy condensado (ha sustituido las histonas por protaminas) se debe realizar un tratamiento con DTT (Ditiotreitol), un reactivo que reduce los grupos disulfuro de las protaminas, lo que descondensa la cromatina: sumergimos los portaobjetos en una jarra coplin con 2XSSC durante 5min. Posteriormente se deshidratan en una serie de etanol (50-70-100%, 1min en cada jarra). Se dejan secar los portaobjetos y se sumergen en una solución de DTT (DTT 5 mM /Triton X-100 al 1%) durante 10min (este tiempo se debe ajustar en cada laboratorio, pudiendo variar entre 8-15min). Se vuelve a repetir los pasos de 2xSSC y etanol.

### **Codesnaturalización:**

La desnaturalización es la separación de las cadenas de la doble hélice del ADN, tanto de la sonda como de los espermatozoides, para permitir la hibridación de la muestra con la sonda complementaria. Para ello, añadimos 10 $\mu$ l de sonda encima de la muestra y cubrimos con un cubreobjetos de 18x18. Sometemos la muestra y la sonda a una temperatura elevada de 74°C durante 4min.

### **Hibridación:**

Es el proceso por el cual el ADN de la sonda se une con el ADN de la muestra por complementariedad de secuencia. Esto se consigue a una temperatura de 37°C durante toda la noche. Los portaobjetos se introducen en una cámara húmeda (caja con papel mojado) para que la sonda no se seque durante la noche.

### **Lavados post-hibridación:**

Se realizan para eliminar el exceso de sonda que no ha hibridado, con soluciones salinas en condiciones astringentes y detergente (NP40). Sumergimos el portaobjetos durante 2min en una jarra coplin con 0,4xSSC-NP40 a 72°, seguido de 30seg en la solución 2xSSC-NP40 a temperatura ambiente. Dejamos secar en oscuridad.

### **Contratinción:**

Permite visualizar la cromatina y así poder ver dónde se localizan las señales de hibridación. Para ello se utiliza DAPI, un fluorocromo que se une al ADN. Aplicamos 10 $\mu$ l de DAPI y cubrimos con un cubreobjetos de 24x40mm. Dejamos a -20°C durante 30min. Se guarda en oscuridad y en frío hasta su estudio.

Se estudian al menos 2000 espermatozoides con un objetivo de inmersión 100X.

## Referencias

1. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. *Fertil Steril*. 2021 Jan;115(1):54-61.
2. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol*. 2005;48(5):703-711.
3. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. 2018;15(6):369-384.
4. Gao M, Pang H, Zhao YH, Hua J, Tong D, Zhao H, et al. Karyotype analysis in large sample cases from Shenyang Women's and Children's hospital: a study of 16,294 male infertility patients. *Andrologia*. 2017;49(4):1-8.
5. Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedin JW, Lawrence AE, Patel A, Peacock S, et al. Comprehensive 5-Year Study of Cytogenetic Aberrations in 668 Infertile Men. *J Urol*. 2010;183(4):1636-1642.
6. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(5):303-312.
7. Mau-Holzmann U. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111:317-336.
8. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(3):265-275.
9. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A, et al. Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3807-3810.
10. Terribile M, Stizzo M, Manfredi C, Quattrone C, Bottone F, Giordano DR, et al. 46,XX testicular disorder of sex development (DSD): A case report and systematic review. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(7):1-13.
11. Flannigan RK, Chow V, Ma S, Yuzpe A. 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis: A case of successful sperm extraction. *Can Urol Assoc J*. 2014;8:45-47.
12. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet*. 2017;136(5):637-655.
13. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: A 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):762-770.
14. Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of azoospermia. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3264.
15. Jaruzelska J, Korcz A, Wojda A, Jedrzejczak P, Bierla J, Surmacz T, et al. Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. *J Med Genet*. 2001;38(11):798-802.
16. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014;2(1):5-19.

17. Quinonez SC, Park JM, Rabah R, Owens KM, Yashar BM, Glover TW, et al. 9p partial monosomy and disorders of sex development: Review and postulation of a pathogenetic mechanism. *Am J Med Genet A*. 2013;161(8):1882-1896.
18. Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A. Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Med Genet*. 2018;30(1):12-20.
19. Singh V, Bala R, Chakraborty A, Rajender S, Trivedi S, Singh K. Duplications in 19p13.3 are associated with male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(10):2171-2179.
20. Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, et al. High Resolution X Chromosome-Specific Array-CGH Detects New CNVs in Infertile Males. *PLoS ONE*. 2012;7(10): e44887.
21. Ma X, Kuete M, Gu X, Zhou H, Xiong C, Li H. Recurrent deletions of the X chromosome linked CNV64, CNV67, and CNV69 shows geographic differences across China and no association with idiopathic infertility in men. *PLoS ONE*. 2017;12(9):1-10.
22. Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J, Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2011;22:2-8
23. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 1996;11:722-726.
24. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 1995;64(4):811-817.
25. Sarrate Z, Blanco J, Marina-Rugero F, Moreno-García JM, Ruiz-Jorro M, Lafuente-Varea R, et al. The use of fluorescence in situ hybridization analysis on sperm: indications to perform and assisted reproduction technology outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(10):1975-1987.
26. Rodrigo L, Meseguer M, Mateu E, Mercader A, Peinado V, Bori L, et al. Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biol Reprod*. 2019;10:1091-1101
27. Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: Diagnostics, indications, and therapeutic implications. Vol. 102, *Fertil Steril*. 2014;102:1534-1539
28. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth Edition, World Health Organization. 2021;105-108.
29. Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fish studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod*. 2007;22:2088-2092
30. Anton E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: Incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57:268-278.
31. Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril*. 2010;93: 1892-1902.

# BANCO DE SEMEN HUMANO EN CANADÁ

Alfonso P. Del Valle<sup>1,2,3</sup>

Maajid Hassan Bhat<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Toronto, Ontario, Canadá. <sup>2</sup>Instituto de Medicina Reproductiva de Toronto - ReproMed, Ontario, Canadá. <sup>3</sup>Andrología y Banco de Tejidos Reproductivos, ReproMed Ltd., Ontario, Canadá.

Autor corresponsal: Dr. Alfonso P. Del Valle, MD, FRCS(C) Director Médico. The Toronto Institute for Reproductive Medicine– ReproMed, 56, Aberfoyle Cres, Suite 300, Toronto, ON M8X 2W4. Correo electrónico: [adelvalle@repromed.ca](mailto:adelvalle@repromed.ca)

## Resumen

En las últimas cinco décadas, la congelación de espermatozoides ha contribuido a preservar la fertilidad para hombres expuestos a tratamientos de cáncer y, a la vez, ha servido como una alternativa reproductiva para parejas e individuos. El aumento en la demanda de semen de donante ha llevado al establecimiento de procedimientos y sistemas de monitoreo para asegurar la eficiencia de su uso y mitigar riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas o genéticas. En este capítulo se describirá el procesamiento de semen de donantes de acuerdo a la regulación y reglamento canadiense. Este reglamento conocido como *Health Canada Directive: Technical Requirements for Conducting the Suitability Assessment of Sperm and Ova Donors (Feb. 04, 2020)* se ha iniciado para regular el procesamiento y uso de semen y ovocitos de donante. “*The Safety Regulations*” o Medidas de Seguridad están enfocadas a que se esclarezca el rol que juegan las provincias y territorios en el monitoreo del uso de esperma de donante en Canadá. Esta Directiva establece los requerimientos técnicos mínimos para determinar la evaluación de idoneidad incluyendo las pruebas de laboratorio, evaluación psicológica y examen físico. ReproMed Ltd. se estableció como el primer Banco de Semen comercial en Canadá en 1989. El éxito de un Banco de Semen está directamente relacionado con sus políticas, procedimientos entrenamiento del personal, así como el siempre estar en la vanguardia en calidad de equipo y establecimiento. El Banco de Semen actual tiene que estar preparado para servir las necesidades de pacientes sin importar el estado civil ni orientación sexual. En este capítulo también haremos alusión a los procesos y procedimientos para la obtención, procesamiento, almacenamiento y distribución de semen de donante en Canadá y particularmente de nuestro establecimiento.

## Historia de los Bancos de Semen

El proceso de criopreservación de semen humano fue reportado por primera vez por el Dr. J.K Sherman, quien introdujo el concepto de congelamiento lento en el año 1953. Sherman reportó el primer embarazo como resultado del uso de semen humano congelado y descongelado (1). Este reporte promovió la idea de establecer bancos de semen congelado. Tanto en Canadá como en EE.UU. los bancos en semen se localizaron principalmente en centros universitarios a través de los 1950's y 1960's. Para el año 1973 existían 16 bancos de semen incluyendo tres de carácter comercial. Estos establecimientos surgieron con el interés de proveer congelación de semen para individuos que estaban llevando acabo la vasectomía y en menor proporción para uso de semen congelado de donante para inseminación heteróloga (2).

Tanto en Canadá, como en el resto del mundo se seguía utilizando semen fresco de donantes para inseminación heteróloga hasta mediados de los 1980's. La epidemia de SIDA en los

1980's tuvo un impacto importante para demostrar los beneficios de congelación de semen y en el surgimiento de Bancos de Semen. El congelar el semen permitirá que el donante de semen demostre negatividad a seroconversión después de 180 días después la congelación. Las autoridades sanitarias en Canadá y *Health Canada*, CDC, FDA en USA, como las organizaciones profesionales (ASRM, CFAS) empezaron a dictar recomendaciones para regular más estrictamente los estudios realizados a los donantes. También establecieron la necesidad de mantener semen congelado por un periodo de 180 días de cuarentena, y no poder ser liberado para su uso hasta completar estudios subsecuentes en el donante al término de los 180 días.

Las primeras iniciativas para regular inseminación de donante y Bancos de Semen en Canadá comenzaron en 1993 cuando la *Royal Commission on New Reproductive Technologies* utilizó el documento publicado por la *Canadian Fertility and Andrology Society, Directive Technical Requirements for Therapeutic Donor Insemination*. Esta regulación se puso en vigor en el año 1996. Es interesante que la mayoría de los Bancos de Semen existentes decidieron cerrar operaciones y otros fueron clausurados después de una inspección. Desde entonces, nuestro establecimiento es el único que continúa con el reclutamiento y procesamiento de donantes canadienses.

### **Bancos de Semen en Canadá**

*Health Canada* modificó aún más los requerimientos en el año 2000 (3). En 2004 entró en vigor la ley, *Assisted Human Reproduction Act* (4), que ahora gobierna todos los aspectos de reproducción asistida en Canadá. Esta ley está enmarcada en el contexto de leyes existentes y aspectos regulatorios. En el año 2016 se definió la regulación en relación a la seguridad del uso de ovocitos y semen de donante, reembolso y administración de la ley. Todas las secciones entraron en vigor en Febrero 4, 2020 (5) y otras en Junio 9, 2020.

### **Prácticas alrededor del mundo**

En diferentes países alrededor del mundo existen guías, estándares y a veces leyes que han sido creadas para efectos de controlar algunos aspectos del proceso de donación. Esto incluye el número de niños por donante, la protección o no de anonimidad, así como lo permitido para el reembolso del donante. Estas prácticas, además de proteger al donante, también sirven para proteger al destinatario y asimismo al niño. A continuación, se muestra una tabla de diferentes países y sus prácticas aplicables (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Prácticas en todo el mundo con respecto a la donación de espermatozoides.

\*La fuente de esta información está disponible en las páginas web de sus gobiernos.

<b>País</b>	<b>Pago Donante</b>	<b>Número de Niños</b>	<b>Anonimidad</b>	<b>Recipientes Permitidos</b>
Australia	No	5-10 familias	No	Todos
Bulgaria	Reembolso de gastos	5 niños	Si	Todos
Canadá	Reembolso de gastos	25 niños / 800,000	Si	Todos
Dinamarca	200-500 DDK	12 niños	Varia	Todos
Francia	No Datos	10 niños	Si	No Datos
Alemania	Varia	15 niños	No	Parejas casadas heterosexuales
Holanda	Reembolso de gastos	25 niños	No	Todos
Nueva Zelanda	Reembolso de gastos	10 familias	No	Todos
UK	Reembolso de gastos	10 familias	No	Todos
Estados Unidos	Pago sin limites	25 nacimientos/ 850,000	Varia	Todos

### **Indicaciones para Crio Preservación de Semen**

Además de las restricciones regulatorias, cada vez es más difícil encontrar donantes con parámetros espermáticos óptimos. Existe preocupación por el efecto de edad avanzada en la fertilidad del hombre (6,7), resultando en un aumento las pérdidas de embarazo, así como otras complicaciones (8,9). Muchos factores como exposición a tóxicos, alcohol, tabaco tienen un efecto en el aumento de mutaciones *de novo* (10,11). Muchos estudios han demostrado el impacto que tiene la edad mayor de 40 años en algunos parámetros de valoración espermáticos (oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia) (10,12,13). Es cada vez más claro que en todo el mundo hay un impacto significativo en fertilidad resultando en una disminución del potencial de fecundabilidad, un incremento en el tiempo esperado para concepción y un aumento en el riesgo de abortar.

En la actualidad los métodos usados para crio preservación son:

- Congelamiento lento (14)
- Congelamiento rápido (15)
- Vitrificación (16)

La vitrificación es un método que si bien podría ser de beneficio en situaciones muy especiales, no resulta práctico para la eficiencia y efectividad de criopreservación en un Banco de Semen.

### **Propósitos de congelación de semen**

1. Auto Conservación
2. Semen de donante

## **Autoconversación**

Los espermatozoides pueden ser congelados en situaciones diversas

- Individuos antes de la vasectomía (2)
- Hombres que recibirán quimioterapia, terapia de radiación o cirugía por cáncer que pone en peligro su fertilidad o se asocia con dificultades de eyaculación (17,18)
- Hombres con oligozoospermia (19)
- Hombres que anticipan una reasignación de género (20)
- Hombres que permanecerán ausentes (militar)
- Hombres que anticipen dificultad de proveer una muestra de semen el día del procedimiento de inseminación intrauterina o fecundación *in vitro* (21)
- Hombres que desean conservar espermatozoides antes de pasar los 40 años de edad.

## **Semen de Donante**

Hay circunstancias por lo que se requiere del uso de semen de donante (22):

- La pareja no es capaz de producir espermatozoides
- Se trata de prevenir la transmisión vertical de enfermedad infecciosa o genética
- Alternativa reproductiva para mujeres solteras o del mismo sexo

### ***Tipos de donantes de espermatozoides:***

- Donantes Regulares
- Donantes Directos (conocidos)

### ***Donantes regulares***

Pueden subdividirse en:

- 1. Donantes Anónimos:*** Una condición para su participación es que su identidad se mantenga secreta tanto para la destinataria como para el niño producto de la donación.
- 2. Donante de Identidad Abierta:*** Estos donantes están dispuestos a compartir información que los identifique o iniciar contacto con la destinataria y/o los niños.

Los donantes no conocidos llenan una aplicación en nuestra página web. Las aplicaciones son revisadas por el Director del Laboratorio y solo aquellos individuos que llenan los requisitos se les darán una oportunidad para una entrevista en persona y se les realiza un espermograma. En esta entrevista preliminar el donante llena un extenso cuestionario diseñado por el establecimiento. Este cuestionario tiene como propósito el identificar conductas de riesgo para enfermedades de transmisión sexual y se destaca también una revisión de la historia médico-genética. Se enfatiza la información médico-genética de tres generaciones. Los documentos llenados por el donante son revisados por el Director Médico y, en base a esta información, se lleva a cabo un examen físico completo y enfocado con la información obtenida en la historia clínica.

### ***Donantes Directos***

También definidos como “donantes conocidos” son referidos al Banco de Semen por los destinatarios. Los destinatarios están interesados en que las muestras espermáticas de estos donantes sean procesadas de acuerdo a las regulaciones existentes para su uso. El donante directo será sometido a un proceso de valoración semejante al del donante no conocido. Los especímenes del donante directo podrán ser usados por la destinataria aún y cuando la valoración

no conforme con la regulación establecido para los donantes no conocidos. Esto permite que estos donantes pueden participar de la donación aunque exista un factor de riesgo. Los donantes directos no requieren el período de cuarentena de 180 días (como mínimo). Estas medidas permiten una mayor flexibilidad para la selección de un potencial donante. En estos casos, el médico tratante y responsable de la inseminación deberá documentar que ha informado a la destinataria de los factores de riesgo encontrados, y se requiere de obtener un consentimiento informado y firmado por la destinataria.

### **Procedimiento para Evaluación de Donantes en Nuestro Establecimiento**

Los donantes potenciales llenan una solicitud, que es revisada por el Director del Laboratorio. Si es adecuada, se le ofrece una cita en el laboratorio para conducir una entrevista y obtener una muestra de semen.

#### **1. Análisis de Semen:**

Los criterios para juzgar la normalidad de una muestra de semen varían entre laboratorios. No hay estándares aceptados globalmente, pero en general el criterio mínimo de calidad será de acuerdo con el WHO manual (2021) (23):

a) Estudio macroscópico evaluando detalles:

*Licuefacción, Apariencia, Olor, Viscosidad, Volumen y pH.*

b) Estudio Microscópico

Un estudio detallado elaborado en un microscópico de contraste de fase para evaluar lo siguiente:

*Motilidad espermática, motilidad progresiva, concentración, anticuerpos antiespermáticos (MAR test), morfología estricta y fragmentación del ADN y cuenta leucocitaria.*

El índice de sobrevivencia después de la congelación deberá ser de más de 50% de la motilidad inicial.

Los siguientes son los parámetros de semen mínimos recomendados para los donantes de nuestro establecimiento (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Parámetros de semen recomendados para donantes de ReproMed Ltd.

<b>Volumen</b>	>2 ml
<b>Motilidad Total</b>	>50 %
<b>Motilidad Progresiva</b>	>40 %
<b>Concentración espermática</b>	>50 x 10 <sup>6</sup> espermatozoides móviles/ ml
<b>Morfología normal (Criterio estricto)</b>	Rango normal 4%
<b>Crio supervivencia</b>	>50% de la motilidad inicial
<b>Fragmentación del ADN</b>	< 20% espermatozoides fragmentados

#### **2. Examen Físico**

Los donantes son sometidos a un examen médico completo incluyendo una evaluación de las áreas genitales se asegurará la ausencia de deshecho uretral, condilomas y úlceras genitales. El examen físico se repite cada seis meses.



### 3. Pruebas de Donantes

En nuestros establecimientos, los donantes son sujetos a una valoración que incluyen estudios de sangre, orina que son repetidos a intervalos de 180 días (Tabla 3).

Tabla 3. Pruebas a realizar y frecuencia de las pruebas.

PRUEBA	FRECUENCIA DE PRUEBA					REQUISITOS DE MUESTRA Y RECOLECCIÓN	
	PANTALLA INICIAL	DONANTE		DONANTE DIRECTO			
		PRUEBA REPETIDA ≥180 días	REEVALUAR ≤180 días	CADA COLECTA	REPETIR REEVALUAR ≤90 días		
Historia Médica	X		X	X		CUESTIONARIO	
Historia Genética	X		X	X		CUESTIONARIO	
Físico	X		X		X (180 days)		
Detección de VIH I+II	X	X			X	SANGRE	
Anticuerpo VHC	X	X			X		
Anticuerpo HBs	X	X			X		
Detección de antígeno HBs	X	X			X		
Anticuerpo HTLV I + II	X	X			X		
T.Pallidium Anticuerpo (específico)	X	X			X		
Anticuerpo IgG contra CMV	X	X			X		
Anticuerpo IgM contra CMV	X	X			X		
Virus del Nilo Occidental (NAT)	X		X		X		SANGRE
<i>Chlamydia trachomatis</i>	X		X		X		ORINA (PCR)
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	X		X		X	ORINA (PCR)	
Grupo sanguíneo + factor RH	X					SANGRE	
SGPT (ALT)	X					SANGRE	
Electroforesis de Hb	X					SANGRE	
Prueba de células falciformes	X					SANGRE	
Detección de portadores	X					SALIVA	
Cariotipo	X					SANGRE	
Morfología del semen (RML Estricta)	X					SEMEN	
Anticuerpos (MAR)	X					SEMEN	
Fragmentación del ADN	X					SEMEN	
Pantalla - ZIKA	X	X	X	X		CUESTIONARIO	
Pantalla - SARS/WHV	X	X	X	X		CUESTIONARIO	

Leyenda: ● RML Prueba específica  
● Prueba requerida

Los especímenes serán liberados para su uso en donación, si el donante ha probado ser negativo después del periodo establecido de 180 días (cuarentena). La regulación canadiense requiere que cada eyaculado obtenido sea negativo para clamidia y gonorrea. La metodología utilizada por el laboratorio que practica estas pruebas deberá tener certificados actualizados expedidos por el Departamento de Salud (*Health Canada*).

#### **4. Estudios Genéticos**

El donante debe llenar un cuestionario extenso, incluyendo información médico/genética de tres generaciones. Este documento es revisado por el Director. En presencia de dudas, un genetista revisa la información y entrevista al donante para el esclarecimiento.

Si el donante se determina que es portador de una condición genética y particularmente autosómica dominante o relacionado a cromosomas sexuales, el donante será rechazado para su participación.

Como parte de la evaluación genética se lleva a cabo un cariotipo. La presencia de alteraciones cromosómicas invalidará su participación como donante.

En los últimos años, hemos introducido en la evaluación del donante el análisis de mutaciones genéticas. Actualmente se utiliza un panel que analiza la presencia de 302 mutaciones genéticas deferentes.

Actualmente recomendamos que las destinatarias de inseminación de donante consideren realizar un estudio extenso de mutaciones genéticas. Conociendo de antemano la existencia de ciertas mutaciones, sobretodo de genes recesivos, permitirá enfocarse en donantes que no compartan mutaciones similares. En nuestra población de donantes hemos encontrado hasta en 60% de donantes portadores de por lo menos una mutación.

En relación a la recomendación de llevar a cabo la evaluación de mutaciones genéticas, el *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) y el *American College of Medical Genetics* (ACMG) (Committee Opinion No. 690-691, 2017) (24) han especificado las mutaciones relevantes para su estudio.

El uso de PGT-M, o estudio genético de preimplantación ha permitido continuar con el uso de un donante, aún y cuando se hubiera demostrado que se comparten mutaciones genéticas. Esto es más usado en el caso de donante directo (conocido). Esto permite la selección de un embrión portador o no afectado para su transferencia.

#### **5. Evaluación Psicológica/Psicométrica**

El establecimiento deberá contar con personal especializado que complete una evaluación psicológica y psicométrica del donante.

#### **6. Otras**

Para asegurar la veracidad de la información proveída por el donante requerimos la obtención de expedientes de los médicos que han consultado anteriormente al donante. Asimismo, obtenemos copias de identificaciones oficiales como pasaportes, licencia de conducir. También se realizará un sondeo de antecedentes criminales y de policía. Finalmente se obtendrán copias de documentos originales en relación a certificado de educación superior y empleo.

#### **Mantenimiento de los Tanques de Almacenamiento**

La selección y el cuidado de los tanques de criopreservación es un aspecto crítico del Banco de Semen. Estos tanques juegan un papel muy importante para mantener la temperatura crítica de -196°C. Además de los requerimientos mínimos, los laboratorios desarrollan procedimientos y prácticas en el manejo del monitoreo de los tanques de congelación (24-26). Recientemente la *Canadian Fertility and Andrology Society* (CFAS) actualizado un documento, antes publicado ([CFAS-Guidance-Document-on-Cryo-Storage-June-2018.pdf](#)) (CFAS, 2021) (27). La *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM 2020) (28), recientemente actualizado también los estándares sugeridos para el mantenimiento de los tanques de almacenamiento. Los requerimientos para laboratorios acreditados incluyen:

- Revisión manual frecuente de los tanques

- Instalación de sistemas de monitoreo electrónico continuo y conectado a sistema de alarma controlado a distancia
- Tener siempre nitrógeno líquido disponible extra
- Equipo adecuado de protección
- Buena ventilación
- Apropiado entrenamiento del personal
- Documentación de procedimientos de emergencia
- Sensores audibles de oxígeno

## Conclusión

Avances importantes en esta área de reproducción asistida, han permitido que parejas con infertilidad hayan logrado consumir su sueño de extender sus familias. Esto también ha servido para dar oportunidad a mujeres solteras, así como mujeres en relaciones del mismo sexo. Este desarrollo científico ha contribuido a aumentar la eficiencia de inseminación de donante. No es raro en la actualidad que FIV se sugiera a un paciente después de 3-4 inseminaciones. Esto resulta en un menor número de especímenes de donante requeridos por embarazo.

*Health Canada* trabajó en conjunto con todas las partes interesadas para desarrollar un proceso regulatorio que permita menos riesgos e incremente la eficiencia en el uso de semen de donante en reproducción asistida. El propósito de estas medidas legislativas y regulatorias es para proteger los derechos del donante, las destinatarias y los proveedores de salud. Contribuyendo además para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas o genéticas a las destinatarias o niños producto de la donación.

## Referencias

1. Sherman JK, Bunge RG. Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 82:686-8.
2. Frankel MS. Role of semen cryobanking in American medicine. *Br Med J.* 1974 Sep 7;3(5931):619-21. Directive H.C. Health Canada Directive: Technical Requirements for Therapeutic Donor Insemination July 2000, Heal. Canada. (2000). <https://doi.org/10.1001/archsurg.135.7.830>.
3. Minister of Justice, Assisted Human Reproduction Act Loi sur la procréation assistée, (2004) 27. <http://lois-laws.justice.gc.ca>.
4. Health Canada, Health Canada Directive: Technical Requirements for Conducting the Suitability Assessment of Sperm and Ova Donors, (2018). <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/consultation-assisted-human-reproduction-regulations/technical-directive.html#a2>.
5. Humm KC, Sakkas D. Role of increased male age in IVF and egg donation: is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertil Steril.* 2013; 99:30-36.
6. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update.* 2004;10:327-39.
7. de la Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod.* 2002 Jun;17(6):1649-56. doi: 10.1093/humrep/17.6.1649. PMID: 12042293.
8. Lian ZH, Zack MM, Erickson JD. Paternal age and the occurrence of birth defects. *Am J Hum Genet.* 1986 Nov;39(5):648-60. PMID: 3788977; PMCID: PMC1684057.
9. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril.* 2001 Feb;75(2):237-

48. doi: 10.1016/s0015-0282(00)01679-4. PMID: 11172821.
10. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012 Aug 23;488(7412):471-5. doi: 10.1038/nature11396. PMID: 22914163; PMCID: PMC3548427.
  11. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. *BJU Int*. 2005 Nov;96(7):1087-91. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05806.x. PMID: 16225533.
  12. Slotter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum Reprod*. 2006 Nov;21(11):2868-75. doi: 10.1093/humrep/del250. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16793993.
  13. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. 2012;2012:854837. doi: 10.1155/2012/854837. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22194740; PMCID: PMC3238352.
  14. Tongdee P, Sukprasert M, Satirapod C, Wongkularb A, Choktanasiri W. Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *J Med Assoc Thai*. 2015 May;98 Suppl 4:S33-42. PMID: 26201132.
  15. Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko V. Novel Approaches to the Cryopreservation of Human Spermatozoa: History and Development of the Spermatozoa Vitrification Technology. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. 2011;2(2):128-145. doi:[10.1177/205891581100200207](https://doi.org/10.1177/205891581100200207)
  16. Huang C, Lei L, Wu HL, Gan RX, Yuan XB, Fan LQ, Zhu WB. Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes. *Fertil Steril*. 2019 Oct;112(4):663-669.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.06.008. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31371041.
  17. Gilbert E, Adams A, Mehanna H, Harrison B, Hartshorne GM. Who should be offered sperm banking for fertility preservation? A survey of UK oncologists and haematologists. *Ann Oncol*. 2011 May;22(5):1209-1214. doi: 10.1093/annonc/mdq579. Epub 2010 Oct 27. PMID: 21030380.
  18. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*. 2001 Nov;76(5):892-900. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02834-5. PMID: 11704107.
  19. Hembree WC, Cohen-Kettenis P, Delemarre-van de Waal HA, Gooren LJ, Meyer WJ 3rd, Spack NP, Tangpricha V, Montori VM; Endocrine Society. Endocrine treatment of transsexual persons: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Sep;94(9):3132-54. doi: 10.1210/jc.2009-0345. Epub 2009 Jun 9. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Jun 16;106(7):e2852. PMID: 19509099.

20. Fabbri R, Ciotti PM, Di Tommaso B, Magrini O, Notarangelo L, Porcu E, Contro E, Venturoli S, Ostetrica C, Umana R. Tecniche Di Crioconservazione Riproduttiva, Riv. It. Ost. Gin. 3 (2004) 33-40.
21. Jouannet P. Evolution of assisted reproductive technologies, Bull Acad Natl Med. 193 (2009) 573-582.
22. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Sixth edition (2021). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
23. Committee Opinion No. 690: Carrier Screening in the Age of Genomic Medicine. Obstet Gynecol. 2017 Mar;129(3):e35-e40. doi: 10.1097/AOG.0000000000001951. PMID: 28225425.
24. Alikani M. Cryostorage of human gametes and embryos: a reckoning. Reprod Biomed Online. 2018 Jul;37(1):1-3. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.004. Epub 2018 May 10. PMID: 29778555.
25. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. Reprod Biomed Online. 2004 Aug;9(2):134-51. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62123-2. PMID: 15333242.
26. CFAS, Guidance document on cryo-storage in assisted reproduction Document, Cryo-Storage Sub Comm. (2021) 3.
27. P. Committees, A. Society, M. Society, A. Reproductive, Cryostorage of reproductive tissues in the in vitro fertilization laboratory: a committee opinion, Fertil. Steril. 114 (2020) 486-491. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.06.019>.

*Revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DEL SEMEN PARA INSEMINACIÓN

Rocío Núñez Calonge<sup>1</sup>

Caballero Peregrín Pedro<sup>2</sup>

Gerardo Cerezo Parra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupo UR Internacional; Madrid, España. <sup>2</sup>Patrono Fundación IERA, Madrid, España. <sup>3</sup>Laboratorio de Andrología y Banco de Espermatozoides LÁFER y FERTIMÉXICO, Ciudad de México, México y Guadalajara, Jalisco, México.

Autora correspondiente: Rocío Núñez Calonge. Correo electrónico: [rocioncalonge@gmail.com](mailto:rocioncalonge@gmail.com)

## Cápsula

Este capítulo describe los principales métodos de procesamiento del semen para inseminación intrauterina, describiendo sus ventajas e inconvenientes.

## Introducción

La inseminación intrauterina (IIU) es la primera técnica de elección en reproducción asistida para parejas con infertilidad inexplicada o factor masculino leve (1,2). Desde su introducción, se han desarrollado métodos de preparación de semen cada vez más sofisticados con el fin de aislar espermatozoides funcionalmente competentes.

Los requerimientos básicos de estas técnicas, sin embargo, han permanecido igual, incluyendo coste-efectividad, simplicidad del procedimiento, eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) causantes de pérdida de función espermática, recuperación de tantos espermatozoides móviles competentes como sea posible, mínimo daño a los mismos, y aumento de la tasa de gestación. También existe el consenso de que en la inseminación intrauterina es necesario quitar los componentes del plasma seminal, puesto que utilizar el semen neto puede ocasionar contracciones uterinas, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, cervicitis o vaginitis, así como un aumento de la posibilidad de aborto (3,4).

Existen pocas guías internacionales que describan el proceso de procesamiento del semen desde la eyaculación a la inseminación. Sólo la OMS en su manual de laboratorio (5), describe los métodos principales, aunque de forma bastante concisa (6). Sin embargo, muchas publicaciones enfocan la IIU en las distintas variables que influyen en los resultados: tiempo de abstinencia sexual, método de recogida del eyaculado, intervalo de tiempo entre la obtención de la muestra, la preparación de esta y la inseminación, temperatura, etc.

Otros trabajos se centran en los resultados de IIU en función del número de espermatozoides recuperados. Algunas publicaciones sugieren una asociación entre la probabilidad de concepción después de IIU y el número total de espermatozoides inseminados y han definido un valor de corte más allá del cual los embarazos alcanzan una meseta (7,8). No obstante, los niveles de corte encontrados en estos estudios difieren sustancialmente desde uno a cinco millones de espermatozoides móviles, lo cual hace que estos resultados no sean útiles en la práctica clínica. En publicaciones más recientes, como la de Findelee y col en 2020 (9), no se ha encontrado una relación entre el número de espermatozoides móviles y la tasa de gestación.

Este capítulo se enfocará en los principales métodos de procesamiento del semen para inseminación intrauterina, describiendo sus ventajas e inconvenientes.

## Principios generales

Con el fin de que los espermatozoides sean funcionales, deben separarse lo más pronto posible del plasma seminal. La exposición prolongada de los mismos con los fluidos seminales hace que descienda considerablemente la motilidad y vitalidad (10). Hay que tener en cuenta que nos referimos al comportamiento del espermatozoide "*in vitro*", de manera que la acción del plasma seminal difiere de la que se le confiere en el entorno fisiológico.

Los principales pasos que hay que realizar en cualquier técnica de preparación de semen para inseminación son:

1. Separar los espermatozoides de otros tipos celulares y restos de contaminación, sobre todo de los leucocitos.
2. Quitar las prostaglandinas del plasma seminal
3. Reducir el volumen de la muestra final a menos de 0,5 ml.

El procesamiento del eyaculado para eliminar el plasma seminal de forma rápida y efectivamente es esencial, tanto en pruebas de laboratorios para comprobar la capacidad fecundante de los espermatozoides, como en Inseminación Intrauterina y Fecundación *In Vitro* (11).

Con frecuencia se utiliza el término de "espermatozoides capacitados" al referirnos a espermatozoides sin plasma seminal e incubados con medio de cultivo, esto es, imitando las condiciones de capacitación "*in vivo*". Sería más correcto referirnos a selección espermática o recuperación de espermatozoides móviles (R.E.M.), ya que la capacitación espermática es un complejo proceso en el cual tienen lugar una serie de modificaciones en el espermatozoide, no siempre discernibles. Las condiciones empleadas "*in vitro*" tratan de imitar las fisiológicas con la eliminación del plasma seminal, y la suspensión de espermatozoides en medios que permitan la supervivencia y capacitación, pero, realmente, no podemos asegurar que la población de espermatozoides seleccionada se encuentre capacitada y sea capaz de fecundar un ovocito.

Existen actualmente numerosas técnicas de recuperación espermática. El llamado "lavado" de los espermatozoides (del inglés *sperm wash*) por centrifugación-sedimentación- y posterior suspensión-incubación en medio de cultivo, es probablemente el método más rápido y eficaz, pero solo puede utilizarse en muestras absolutamente normales. Cualquier anomalía espermática (oligo, asteno o teratozoospermia hace recomendable utilizar los métodos más ampliamente utilizados: el "*swim-up*" y la centrifugación en gradientes de densidad.

En cualquier caso, después de la licuefacción del eyaculado, es necesario separar los espermatozoides del plasma seminal, como se ha comentado anteriormente, para prevenir contracciones uterinas y la formación de ROS. Aunque ninguna de las técnicas actuales consigue todas las condiciones ideales, se siguen usando en función de la calidad del eyaculado, y comparando con la muestra inicial, el uso de las técnicas de separación, mejoran significativamente los parámetros espermáticos.

## Selección espermática y condiciones del análisis

Para cualquiera de los métodos de selección espermática para IUI, el medio de cultivo sugerido es una solución salina con un tampón apropiado para las condiciones ambientales en las que se procesarán las muestras seminales suplementada con proteínas, empleándose en general la albúmina como suplemento proteico. Es necesario que la albúmina utilizada para suplementar los medios esté altamente purificada y libre de contaminación viral, bacteriana y de priones. Para ello, existen en el mercado medios de cultivo y albúmina elaborados específicamente para reproducción asistida.

La temperatura es otro factor importante para tener en cuenta en la valoración de la motilidad espermática. La mayoría de los trabajos refieren la utilización de los 37°C como temperatura óptima para la interpretación de los parámetros cinéticos, y todos ellos coinciden en que pequeñas variaciones de temperatura, inciden en cambios de motilidad. En un trabajo de

Chan y col (12) se comprueba que el pretratamiento de espermatozoides a 40°C incurre en una mayor proporción de población de gametos hiperactivados y una mejoría en las características de motilidad en general.

Si el incubador contiene solo aire y la temperatura es de 37°C, el medio debe tamponarse con Hepes o un tampón similar, y las tapas de los tubos deben cerrarse herméticamente. Si la atmósfera del incubador es de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire y la temperatura de 37°C, entonces el medio se tampona con bicarbonato de sodio o un tampón similar a una concentración específica, y las tapas de los tubos deben estar sueltas para permitir el intercambio de gases. De esta forma, el pH del medio es compatible con la supervivencia espermática.

Los espermatozoides procesados "*in vitro*" en condiciones de capacitación pueden, no obstante, evidenciar signos de su estado fisiológico. Los cambios en la motilidad espermática y la adquisición de la capacidad de sufrir la reacción acrosómica son aspectos críticos de la capacitación. Observando a distintos momentos de incubación la motilidad espermática comprobamos que existen diferentes patrones de movimiento para algunos espermatozoides que no se observan en el eyaculado con el plasma seminal y que, además, estos varían a lo largo del tiempo. Los espermatozoides "*in vitro*" pueden sufrir un cambio en la motilidad flagelar que se expresa desde un movimiento lineal y progresivo otro con menor linealidad y mayor desplazamiento lateral de la cabeza, característico de la motilidad hiperactivada (HA).

### **Técnicas principales de selección espermática**

Como se ha comentado anteriormente, son el *swim-up* y la centrifugación en gradientes de densidad.

#### ***Swim-up***

Fue la primera técnica de preparación espermática para IUI, descrita por Mahadevan en 1981 (13). Se basa en la motilidad inicial de los espermatozoides que nadan desde el sedimento, una vez centrifugado el eyaculado, hasta el medio de cultivo.

Es la técnica de elección en el caso de muestras seminales en fresco, no excesivamente filantes o viscosas y/o que no presenten abundante celularidad.

### **MÉTODO DE PREPARACIÓN (5)**

- a) Mezclar bien la muestra de semen.
- b) Colocar la muestra de semen en un tubo de centrifuga cónico estéril de 15 ml y situar suavemente el mismo volumen de medio por encima. Alternativamente, pipetear el semen con cuidado debajo de del medio de cultivo.
- c) Inclinar el tubo en un ángulo de aproximadamente 45° para aumentar el área de superficie del semen con la interfase del medio de cultivo e incubar durante 1 hora a 37 °C.
- d) Devolver suavemente el tubo a la posición vertical y retirar el 1 ml superior de medio. Esto contendrá espermatozoides altamente móviles.
- e) Diluir la muestra recogida con 1,5–2,0 ml de medio.
- f) Centrifugar a 300–500 g durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.
- g) Resuspender el sedimento espermático en 0,5 ml de medio para la evaluación de concentración, motilidad total y motilidad progresiva (Figura 1).



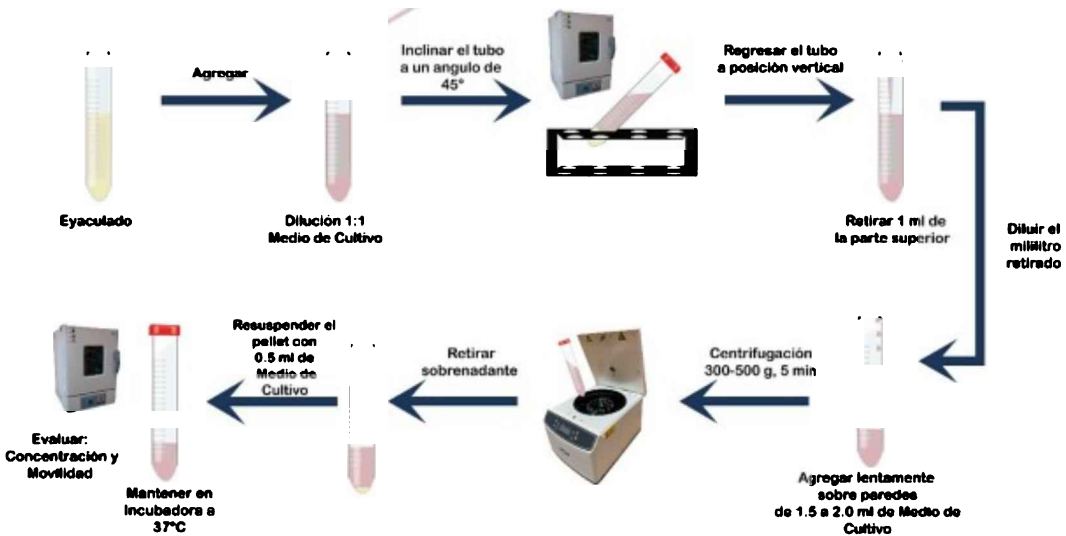


Figura 1. Método de procesamiento del semen para Inseminación intrauterina con la técnica del *swim-up*.

### Centrifugación en gradientes de densidad

La centrifugación en gradiente de densidad se inició con el uso de Percoll™. En 1996, sin embargo, el Percoll™ se retiró del mercado clínico, ya que se afirmó que la sílice recubierta de polivinilpirrolidona (PVP) en Percoll™ contenía endotoxinas (14). Desde entonces, se introdujeron varios productos sin endotoxinas con partículas de sílice recubiertas de silano. En primera instancia, la investigación se concentró en comparar estos nuevos productos con Percoll™ y se encontraron resultados contradictorios con respecto a la motilidad y la tasa de recuperación del esperma (15-17). A pesar de estos desacuerdos, los productos recubiertos de silano son ahora ampliamente utilizados (18).

Es la técnica de elección en el caso de muestras de semen congeladas, con mucha filancia o viscosidad, o con abundancia de restos celulares.

Los espermatozoides móviles se separan del plasma seminal en base a la diferencia de gravedad entre cada una de las fases del gradiente, y entre los espermatozoides y otras células del semen. Las soluciones de gradientes de densidad están formadas por una suspensión de partículas de sílice de unos 15-30 nm de diámetro. Están recubiertas de PVP por la toxicidad de la sílice. Diluyendo la solución madre en medio de cultivo se obtienen soluciones de diferente densidad (gravedad específica). Se preparan gradientes discontinuos de densidad (generalmente de 45 y 90%). En el mercado existen diferentes clases: Puresperm (Nidacon), Ixaprep (Medi-Cult), Isolate (Irvine), entre otros.

El gradiente al 90% está formado por 9 ml de solución de gradiente y 1 ml de medio de cultivo y el gradiente de 45% se forma con 4,5 ml de solución de gradiente y 5,5 ml de medio de cultivo.

### MÉTODO DE PREPARACIÓN

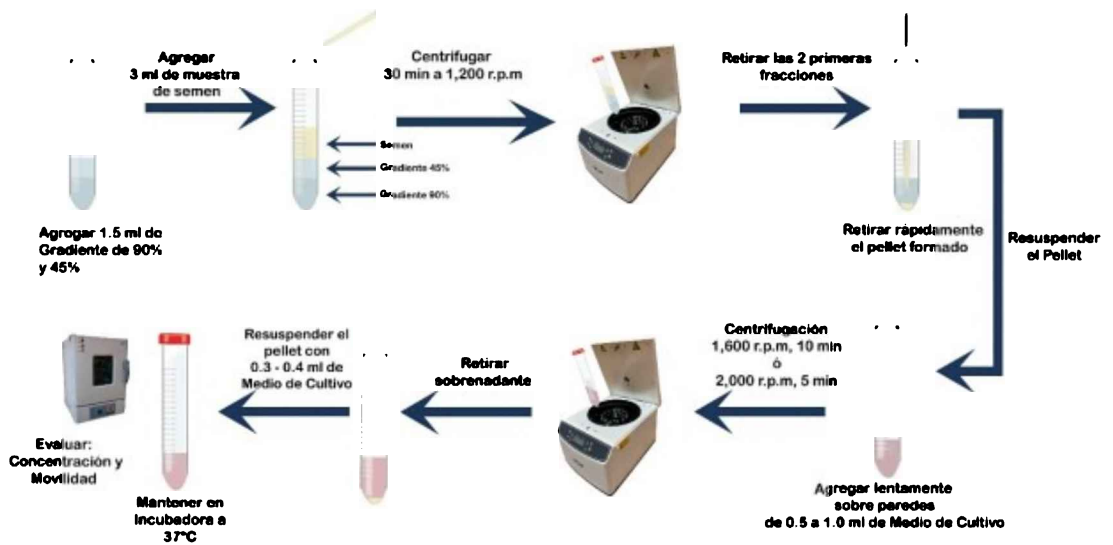
- a) En un tubo cónico se añaden 1,5 ml de gradiente al 90% y 1,5 ml de gradiente al 45% (el gradiente de mayor densidad irá siempre debajo), observándose claramente las 2 fracciones.
- b) Posteriormente se añade la muestra de semen (máximo 3 ml de muestra por gradiente), observándose ahora 3 fracciones bien diferenciadas.
- c) Se centrifuga 30 minutos a 300 g
- d) A continuación, se retiran las dos primeras fracciones y las dos bandas con una pipeta bulbo por una pared del tubo; posteriormente y con rapidez se retira el pellet formado con una pipeta Pasteur. Todo el material que se utilice para obtener muestras que posteriormente serán utilizadas en un tratamiento debe ser estéril.

El sedimento contiene los espermatozoides funcionalmente normales. Los espermatozoides inmóviles, leucocitos y otras células permanecen en la interface entre las fracciones de 45 y 90%.

e) El sedimento recuperado se pasa a otro tubo Falcon, se añaden entre 0,5 y 1,0 ml de medio de cultivo y se centrifuga 10 minutos a 300 g ó 5 min a 500 g.

f) Se retira el sobrenadante formado y se añaden 0,3-0,4ml de medio de cultivo en el que se resuspenderá el sedimento espermático.

g) Se mantiene en estufa con atmósfera de aire y 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 45 minutos y se determina la concentración y motilidad de la suspensión espermática (**Figuras 2 y 3**).



**Figura 2.** Técnica de procesamiento de semen para inseminación intrauterina por el método de centrifugación en gradientes de densidad.



**Figura 3.** Imagen de una muestra de semen preparada con el método de centrifugación en gradientes de densidad. a) Antes de la centrifugación, y b) posterior a la centrifugación, donde podemos observar la formación del pellet.

### Comparación de *Swim-up* y Centrifugación en gradientes de densidad para IU

En un estudio realizado comparando ambos métodos, el método de centrifugación en gradientes de densidad resultó ser más eficaz en la recuperación porcentual de la concentración de espermatozoides móviles en comparación con el método de *swim-up*. Sin embargo, la fecundidad se mantuvo igual en ambos grupos. y el éxito dependió en gran medida de la edad de la mujer pareja, duración de la infertilidad, indicación de IIU, número de ciclos de tratamiento y tipo de infertilidad (19).

La revisión sistemática por Cochrane (20) en 2019, analizó cinco trabajos que comparaban dos o tres técnicas entre sí. Se puede sospechar la heterogeneidad con respecto a las indicaciones incluidas, ya que varían ampliamente entre los cinco estudios o no se describieron con claridad. La revisión no encontró diferencias significativas en las tasas de embarazo entre las técnicas de preparación de semen: técnica de *swim-up* versus técnica de centrifugación en gradientes de densidad (OR = 1,57, IC del 95%: 0,74–3,32); *swim-up* versus “lavado” (Dilución y Centrifugación) (OR = 0,41, IC del 95%: 0,41-1,10) o técnica de centrifugación en gradiente de densidad frente a *swim-up* y “lavado” (OR = 1,76, 95% CI: 0,71–5,44). Los autores concluyen que la muy baja calidad de la evidencia disponible significa que no es posible tener certeza acerca de la efectividad relativa de las diferentes técnicas de preparación: *swim-up* versus centrifugación en gradientes de densidad versus técnica de “lavado” (Dilución y centrifugación). Ningún estudio informó sobre las tasas de nacidos vivos. No existe seguridad sobre una diferencia en las tasas de embarazo clínico, las tasas de embarazo en curso, las tasas de embarazo múltiple o el aborto espontáneo y las tasas por pareja entre las tres técnicas de preparación de espermatozoides. Se justifican ensayos aleatorizados adicionales que informen datos de nacidos vivos.

Recientemente, Raad y col (21), compararon el efecto del semen *swim-up* (S-SU), pellet *swim-up* (P-SU), gradiente de densidad (DG) y DG seguido de SU (DG / SU) sobre la motilidad, morfología, fragmentación del ADN, reacción acrosómica, especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad mitocondrial, concluyendo que S-SU fue más eficaz que DG en la selección de mejores espermatozoides en términos de integridad del ADN, niveles de ROS, estado del acrosoma y actividad mitocondrial.

## **Métodos de selección espermática y fragmentación de ADN**

La técnica de preparación de los espermatozoides para IIU también puede suponer un riesgo de daño espermático y puede influir en la tasa de fragmentación del ADN y el resultado de la IIU (22). En un estudio de Younglai y col (23), no se encontró que la centrifugación tenga un efecto significativo sobre la fragmentación del ADN de los espermatozoides. Volpes (24) concluyó que la técnica de *swim-up* se asociaba con las tasas de fragmentación de ADN más bajas en comparación con la centrifugación en gradiente de densidad en ciclos de FIV / ICSI. En casos de teratozoospermia, aunque ambos métodos mejoraron los resultados, el método de centrifugación en gradientes de densidad fue superior al *swim-up* a la hora de obtener un mayor número de espermatozoides morfológicamente normales (22).

La mayoría de los trabajos en los que se analiza la fragmentación de ADN asociada a las técnicas de selección de espermatozoides para IUI, se ha estudiado únicamente fragmentación de cadena sencilla. Enciso y col (25), sin embargo, realizaron un estudio en el que comparaban las tasas de fragmentación de cadena doble y cadena sencilla antes y después de la recuperación espermática con *swim-up* y centrifugación en gradientes de densidad. Los resultados de este estudio indicaron que *swim-up* y centrifugación en gradientes de densidad son igualmente eficientes en la eliminación de espermatozoides que contienen daño de ADN de doble cadena y espermatozoides con ADN altamente dañado (degradado), que se caracteriza por la presencia de roturas de ADN de cadena simple y doble. Sin embargo, la técnica de centrifugación en gradientes de densidad es más eficiente en la selección de espermatozoides que están libres de daño en el ADN de una sola hebra.

Estos resultados coinciden con trabajos más recientes en los que se compararon los valores basales antes de procesar las muestras de semen con los obtenidos después de *swim-up*, concluyendo que el *swim-up* es un método idóneo para recuperar poblaciones espermáticas con menor índice de fragmentación (26).

Por otra parte, a la hora de establecer el índice de fragmentación, en la mayoría de los casos se ha realizado desde el punto de vista estático. Sin embargo, es importante resaltar que la

fragmentación de ADN aumenta con el tiempo, tanto en el semen en fresco como después de su procesamiento para IIU (27). Es, por tanto, de vital importancia que las muestras de semen, una vez procesadas, se utilicen para inseminación lo antes posible.

En un estudio reciente realizado por Zarchi (28) comparando la vitalidad espermática a temperatura ambiente y 37°C después de procesar las muestras por centrifugación en gradientes de densidad, comprueban que no hay diferencias en los distintos parámetros analizados, incluyendo la fragmentación de ADN, pero sí la hay a partir de 2 horas de incubación. Estos autores insisten en la necesidad de utilizar las muestras de semen lo más rápidamente posible tras el procesamiento de estas.

### **Separación de espermatozoides móviles sin centrifugación**

Aunque muchos trabajos demuestran que las técnicas de *swim-up* y centrifugación en gradientes de densidad, las más utilizadas para recuperación espermática en IIU, no producen un aumento de fragmentación de ADN, desde hace tiempo se conoce que la centrifugación es dañina para los espermatozoides (29).

Con el fin de prevenir el daño inducido por centrifugación en los espermatozoides, se ha intentado desarrollar dispositivos sin centrifugación para aislar los espermatozoides (30-32). Según la motilidad y con la ayuda de la gravedad, los espermatozoides pueden sedimentar en el fondo de un tubo sin centrifugación. Por lo tanto, se espera que la migración-sedimentación (MS) de los espermatozoides evite los efectos deletéreos de la centrifugación. Kiratli y col (33) demostraron una mejora de la motilidad en la fracción de espermatozoides extraída mediante el uso de la técnica de MS en comparación con otros métodos convencionales. Más recientemente, Meitei y col en 2021 (34) compararon el uso del método de migración sedimentación frente a técnicas convencionales de selección espermática con centrifugación (gradientes de densidad y *swim-up*), estudiando características funcionales espermáticas como la integridad mitocondrial, fosforilación de la tirosina, reacción acrosómica y ultraestructura. Estos autores concluyeron que el método de MS es eficiente en la selección espermática para IIU, obteniéndose una mejor población espermática y siendo un método más fácil para usar en las unidades de reproducción asistida e incluso en las consultas médicas.

Gode y colaboradores (35), compararon los resultados en términos de tasa de gestación utilizando la centrifugación en gradientes de densidad y el chip de microfluidos para la selección espermática en IIU. Un total de 265 pacientes fueron incluidos en el estudio. Se usó el chip de microfluidos para selección espermática y el método de centrifugación en gradientes de densidad para preparar el semen en 133 y 132 pacientes, respectivamente. La motilidad total de espermatozoides fue menor en el grupo de selección espermática por microfluidos ( $35,96 \pm 37,69$  vs.  $70,66 \pm 61,65$ ). Después de la preparación del semen la motilidad espermática fue mayor en el grupo del microfluido ( $96,34 \pm 7,29$  vs.  $84,42 \pm 10,87$ ). Las tasas de gestación fueron de 18,04 % en el grupo del microfluido y de 15,15 % en el grupo de gradiente de densidad. Las *odds ratio* ajustadas para la gestación clínica en el grupo del microfluido comparado con el grupo de gradientes de densidad fue 3,49 (intervalo de confianza 95% 1,12-10,89). Los autores concluyen que el método de selección espermática por microfluidos aumenta la tasa de gestación clínica comparado con el de gradientes de densidad en ciclos de IIU.

Jafek y col (36), han desarrollado recientemente un instrumento que puede realizar una preparación de semen automatizada para IIU. El instrumento toma como entrada una muestra de semen diluido y produce una muestra preparada lista para la inseminación. Los autores comparan los resultados del dispositivo con el método de gradientes de densidad, procesando alícuotas de 0,5 ml de muestras de pacientes en cada tratamiento. En 5 min de tiempo de operación, el instrumento recupera un promedio del 86% de todos los espermatozoides y el 82% de los espermatozoides progresivamente móviles de la muestra original, mientras elimina los glóbulos blancos, reemplazando el plasma seminal. En 25 min de tiempo de operación, la centrifugación en gradiente de densidad recupera un promedio del 33% de todos los espermatozoides y el 41% de espermatozoides progresivamente móviles.

## Conclusiones

- Es imprescindible retirar el plasma seminal del eyaculado para poder utilizarlo en inseminación intrauterina.
- Las técnicas más utilizadas son el *swim-up* y la centrifugación en gradientes de densidad. La utilización de una u otra dependerá de la calidad inicial del eyaculado. En casos de muestras con mucha filancia o con gran celularidad es preferible emplear la centrifugación en gradientes de densidad.
- Tras la recuperación espermática con cualquiera de las técnicas es necesario que no transcurra más de una hora para la inseminación.
- Cualquiera de los métodos de recuperación espermática obtiene poblaciones de espermatozoides con menor índice de fragmentación de ADN que en las muestras en fresco.
- Se están diseñando sistemas automáticos de selección espermática a partir de semen para inseminación, con buenos resultados de recuperación, que podrán sustituir a estas técnicas en un futuro cercano.

## Referencias

1. Farquhar CM, Liu E, Armstrong S, Arroll N, Lensen S, Brown J. Intrauterine insemination with ovarian stimulation versus expectant management for unexplained infertility (TUI): a pragmatic, open-label, randomised, controlled, two-centre trial. *Lancet*. 2018;391:441-45
2. Ombelet W. The revival of intrauterine insemination: evidence-based data have changed the picture. *Facts Views Vis Obgyn*. 2017;9:131-132.
3. Wang\_FN. Assisted Human Reproductive Technology. Washington DC: Hemisphere Publishing Co, 1991.
4. Yan\_RY. Practical Eugenics. 2nd Edition. Beijing: People Health Publishing House, 199.
5. Baldi E, Gallagher MT, Krasnyak S, Kirkman-Brown J; Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Extended semen examinations in the sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: contributing to the understanding of the function of the male reproductive system. *Fertil Steril*. 2022 Feb;117(2):252-257
6. Lemmens L, Kos S, Beijer C, Braat DDM, Nelen WLD, Wetzels AMM; Dutch Foundation for Quality Assessment in Medical Laboratories. Techniques used for IUI: is it time for a change? *Hum Reprod*. 2017;32:1835-1845.
7. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80:74-81.
8. Madbouly K, Isa A, Habous M, Almannie R, Abu-Rafea B, Binsaleh S. Postwash total motile sperm count: should it be included as a standard male infertility work up. *Can J Urol*. 2017;24:8847-8852.
9. Findekleer S, Radosa JC, Radosa MP, Hammadeh ME. Correlation between total sperm count and sperm motility and pregnancy rate in couples undergoing intrauterine insemination. *Sci Rep*. 2020;10:7555

10. Mortimer D Practical laboratory andrology. Oxford, Oxford University Press, 1994a.
11. Mortimer D Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, 1994b.
12. Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, King A. Heat-induced hyperactivation. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15:32-38.
13. Mahadevan M. Capacitation of spermatozoa. *Acta Eur Fertil.* 1981;12:329-35.
14. Svalander PC, Lundin K, Holmes PV. Endotoxin levels in Percoll® density gradient media used to prepare sperm for human IVF treatment. *Hum Reprod* 1995; 10:130.
15. McCann CT, Chantler E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology, and the acrosome reaction. *Int J Androl* 2000; 23:205–209.
16. Ren SS, Sun GH, Ku CH, Chen DC, Wu GJ. Comparison of four methods for sperm preparation for IUI. *Arch Androl* 2004; 50:139–143.
17. Tsai YC, Lin MY, Chen SH, Kang CY, Tsai YT, Lin LY, Chuan LT, Huang KF. Comparing the clinical outcomes of intrauterine insemination by two different density gradient preparation methods. *J Chin Med Assoc* 2004; 67:168–171.
18. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:108.
19. Butt A, Chohan MA. Comparative efficacy of density gradient and swim-up methods of semen preparation in intrauterine insemination cycles. *J Pak Med Assoc.* 2016;66:932-7.
20. Boomsma CM, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;10:CD004507.
21. Raad G, Bakos HW, Bazzi M, Mourad Y, Fakhri F, Shayya S, Mchantaf L, Fakhri C. Differential impact of four sperm preparation techniques on sperm motility, morphology, DNA fragmentation, acrosome status, oxidative stress, and mitochondrial activity: A prospective study. *Andrology.* 2021;9:1549-1559.
22. Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, et al. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:1161–6
23. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2001;16:1950–3.
24. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:765.
25. Enciso M, Iglesias M, Galán I, Sarasa J, Gosálvez A, Gosálvez J. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian J Androl.* 2011;13:764-8.
26. Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, Bozkurt N, Erdem M. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35: 1083-1089.
27. Gosálvez J, Núñez R, Fernández JL, López-Fernández C, Caballero P. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and

- gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*. 2011;43:373-7.
28. Karimi Zarchi M, Maleki B, Dehghani Ashkezari M, Motamed Zadeh L, Agha-Rahimi A. The Effects of *In Vitro* Incubation of Asthenoteratozoospermic Semen after Density Gradient Centrifugation at Room Temperature and 37°C on Sperm Parameters, Chromatin Quality and DNA Fragmentation in a Short Time Period. *J Reprod Infertil*. 2020;21:275-282.
  29. Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod*. 1993;8:1087-92
  30. Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K, et al. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 2016;105:315-21.
  31. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod*. 2018;33: 1388-93.
  32. Berendsen JTW, Kruit SA, Atak N, Willink E, Segerink LI. Flow free microfluidic device for quantifying chemotaxis in spermatozoa. *Anal Chem*. 2020;92:3302-6.
  33. Kiratli S, Yuncu M, Kose K, Ozkavukcu S. A comparative evaluation of migration sedimentation method for sperm preparation. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;64:122-9.
  34. Meitei HY, Uppangala S, Sharan K, Chandraguthi SG, Radhakrishnan A, Kalthur G, Schlatt S, Adiga SK. A Simple, Centrifugation-Free, Sperm-Sorting Device Eliminates the Risks of Centrifugation in the Swim-Up Method While Maintaining Functional Competence and DNA Integrity of Selected Spermatozoa. *Reprod Sci*. 2021;28:134-143.
  35. Gode F, Bodur T, Gunturkun F, Gurbuz AS, Tamer B, Pala I, Isik AZ. Comparison of microfluid sperm sorting chip and density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril*. 2019;112:842-848.
  36. Jafek A, Feng H, Brady H, Petersen K, Chaharlang M, Aston K, Gale B, Jenkins T, Samuel R. An automated instrument for intrauterine insemination sperm preparation. *Sci Rep*. 2020;10:21385.

*Revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# TÉCNICAS DE MICROMANIPULACIÓN ESPERMÁTICA EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Steven D. Fleming

David R. Morroll

Cooper Surgical Fertility Solutions, Sidney, Australia.

Autor correspondiente: Dr. Steven D. Fleming. Cooper Surgical Fertility Solutions, Level 3, Customs House, 31 Alfred Street, Sydney, New South Wales 2000, Australia. Phone: +61-2-9191 1528. Correo electrónico: [steven.fleming@coopersurgical](mailto:steven.fleming@coopersurgical)

## Cápsula

Las técnicas de micromanipulación de espermatozoides se componen predominantemente de inyección intracitoplasmática de espermatozoides, inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente e inyección fisiológica de espermatozoides intracitoplasmáticos. Se revisan estas técnicas y su uso clínico.

## Descripción general

La micromanipulación de espermatozoides es esencialmente una manipulación manual de los espermatozoides con gran aumento utilizando microherramientas. En el laboratorio de reproducción asistida se ha aplicado a diversas técnicas (tabla 1) entre las que se encuentran la transferencia de espermatozoides por microinseminación (MIST) o inseminación subzonal (SUZI), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el examen de morfología de organelos de espermatozoides móviles (MSOME) para inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) e ICSI fisiológica (PICSI). Además de la ICSI con espermatozoides maduros, también se han utilizado la inyección de espermátidas elongadas (ELSI), la inyección de espermátidas redondas (ROSI) y la inyección de espermatozoides secundarios (SESI) para aliviar la infertilidad masculina grave (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Chronological development of sperm micromanipulation techniques in the human.

Technique	Citation
MIST	Laws-King <i>et al</i> , 1987 (1)
ICSI	Lanzendorf <i>et al</i> , 1988 (2)
ELSI	Fishel <i>et al</i> , 1995 (3)
ROSI	Tesarik <i>et al</i> , 1995 (4)
SESI	Sofikitis <i>et al</i> , 1998 (5)
MSOME/IMSI	Bartoov <i>et al</i> , 2001 (6)
PICSI	Parmegiani <i>et al</i> , 2010 (7)



También hay varias modificaciones de la técnica ICSI, incluyendo láser-ICSI y piezo-ICSI, siendo esta última una técnica particularmente popular en Japón. Dado que la micromanipulación de espermatozoides depende en gran medida del operador y requiere algo de tiempo, existe interés en desarrollar técnicas más avanzadas para la micromanipulación de espermatozoides, como ICSI robótico e ICSI con micropipetas fotónicas. Sin embargo, estas técnicas avanzadas requieren un mayor desarrollo antes de su introducción en la práctica clínica. Por lo tanto, esta revisión se limitará solo a aquellas técnicas que actualmente se utilizan de forma rutinaria dentro del laboratorio de reproducción asistida.

## **Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)**

### **Introducción**

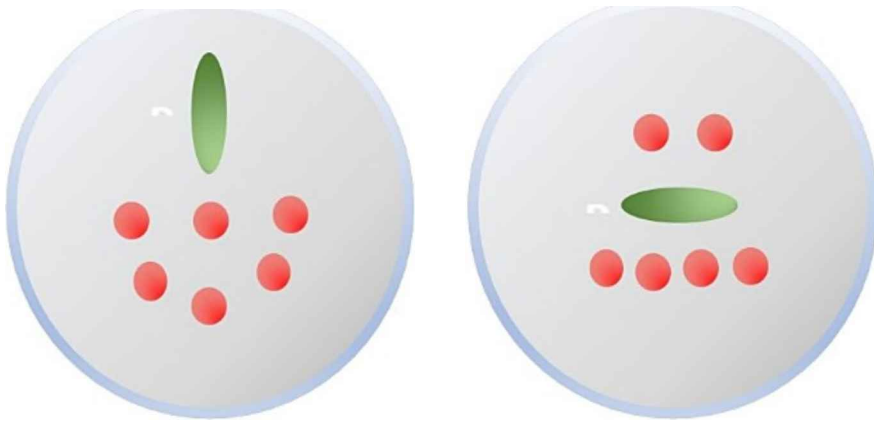
La técnica ICSI evolucionó a partir de intentos anteriores para resolver la infertilidad por factor masculino grave utilizando MIST/SUZI (1,8). Al igual que con la fertilización in vitro (FIV) de rutina, SUZI fue un compromiso entre inyectar una cantidad suficiente de espermatozoides en el espacio perivitelino para lograr la fertilización y evitar la polispermia, por lo que el siguiente paso lógico fue perfeccionar una técnica que requería la inyección de un solo espermatozoide directamente en el ooplasma del ovocito (2,9). Poco después, se informó del primer nacido vivo y la ICSI se anunció como un hito en el tratamiento de la infertilidad por factor masculino grave utilizando espermatozoides eyaculados o testiculares (10,11). Desde entonces, ICSI se ha aplicado cada vez más a las indicaciones de factor no masculino y ahora es la técnica de inseminación predominante utilizada en reproducción asistida (12-14).

### **Técnica**

La aplicación exitosa de la técnica ICSI depende de la apreciación de la necesidad de imitar algunas de las etapas del proceso de fertilización in vivo (15). Para poder replicar fielmente esos procesos, es necesario contar con una plataforma de micromanipulación que incorpore un dispositivo antivibración, un microscopio invertido, micromanipuladores y microinyectores (16). En este sentido, las características clave de un equipo de alta calidad incluyen la instalación y el ajuste de la microherramienta que se puede realizar "sobre la marcha" (es decir, la posición de la punta de la micropipeta permanece constante durante el ajuste del ángulo del portaherramientas), control fino de manipuladores e inyectores, y mantenimiento preciso de la temperatura.

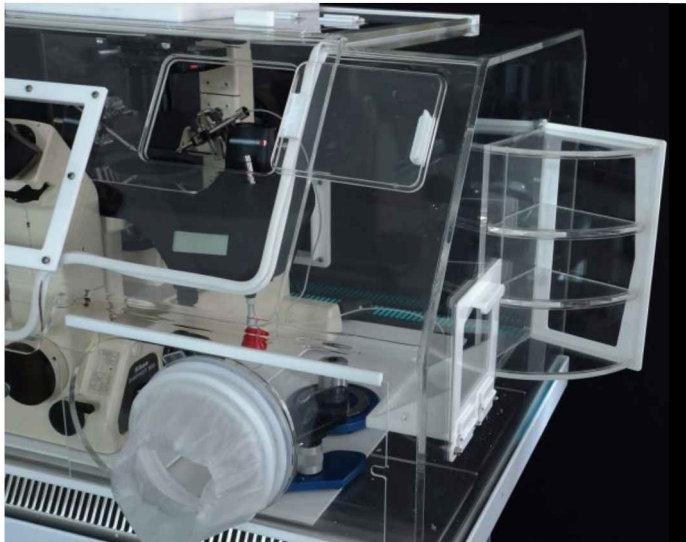
([https://www.youtube.com/watch?v=e\\_ukn4PwDro](https://www.youtube.com/watch?v=e_ukn4PwDro)).

La preparación del semen antes de la micromanipulación es obligatoria, ya que selecciona una población de espermatozoides móviles con morfología normal y propiedades funcionales y genéticas intactas, incluido un daño mínimo en el ADN (17). Dado que no parece haber ninguna diferencia a este respecto entre la centrifugación en gradiente de densidad (DGC) y la centrifugación por inmersión (18), la elección de la técnica de preparación de esperma tiende a estar determinada por la calidad de la muestra de semen, ya que es posible una mayor recuperación de esperma con DGC. Se recomienda preparar una placa ICSI al menos 30 minutos antes de su uso para que haya tiempo suficiente para que alcance los 37 °C en una incubadora sin gas. En esta placa se colocan microgotas de medio tamponado HEPES y/o MOPS suplementado con albúmina de suero humano (HSA) para ovocitos, equilibrio de las micropipetas y para una muestra de espermatozoides preparados, más una gota alargada de polivinilpirrolidona al 10% (PVP) para facilitar su ubicación con gran aumento, todas las gotas están completamente recubiertas de aceite mineral (**Figura 1**).



**Figura 1.** Algunos diseños de las placas de ICSI tradicionales.

A diferencia del bicarbonato, HEPES y MOPS son tampones zwitteriónicos, por lo que no dependen de un equilibrio con CO<sub>2</sub> para mantener su rango de tampón de pH, lo que permite realizar ICSI fuera de un entorno de gas controlado. Sin embargo, si el practicante de ICSI desea evitar cambiar entre medios tamponados con bicarbonato y zwitterion, mientras mantiene el pH fisiológico, es posible realizar ICSI utilizando un medio tamponado con bicarbonato dentro de un gabinete biológico provisto de suministro de gas (**Figura 2**).

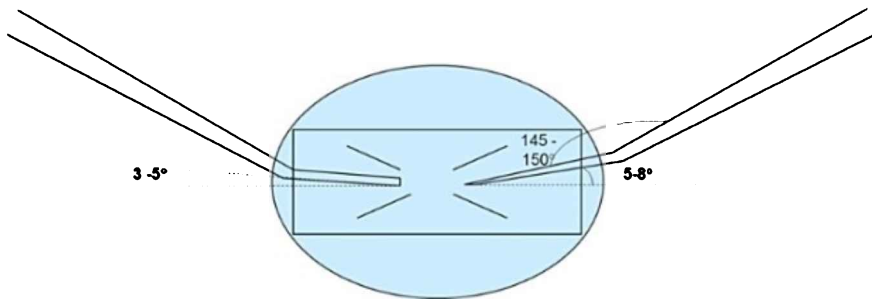


**Figura 2.** Cabina biológica con almohadilla antivibración integrada y suministro de gas externo opcional (foto cortesía de Dieter Regel en Tek-Event).

Para un rango completo de manipulación, es importante colocar todas las microgotas hacia el centro y alejadas de la periferia de la placa ICSI para evitar que las micropipetas se ensucien en el lado elevado de la placa. Durante la fecundación, el plasmalema y el oolema del espermatozoide se fusionan y todo el espermatozoide es engullido por el ovocito (19). Esto permite la provisión de los siguientes componentes espermáticos que son esenciales para la fertilización y la embriogénesis (20): ADN paterno que contribuye al genoma cigótico; el centriolo proximal del espermatozoide que participa en la formación del huso mitótico; y factores activadores de ovocitos citosólicos de esperma.

Para imitar este proceso in vitro, el plasmalema espermático debe romperse antes de su aspiración en la pipeta de inyección y el oolema debe romperse antes de depositar el espermatozoide en el ooplasma (21). Para lograr esto, los ángulos de los portaherramientas deben ajustarse con precisión de modo que la punta de la micropipeta de inyección se convierta en el

primer punto de contacto con el fondo de la placa ICSI, de modo que los espermatozoides puedan manipularse y aspirarse de manera eficiente, y la micropipeta de sujeción debe estar virtualmente paralelo con el fondo del plato para que los ovocitos puedan orientarse y aspirarse eficientemente (**Figura 3**). El ajuste fino de la pipeta de inyección generalmente se realiza después del equilibrio con los medios, verificando que su punta se flexione cuando se mueve de un lado a otro cuando está en contacto con la superficie de la placa ICSI. Si el ángulo de la pipeta de inyección es demasiado pequeño, primero entrará en contacto con el plato más atrás, levantando efectivamente la punta de la micropipeta de la superficie del plato a medida que se baja, lo que dificultará la manipulación y aspiración de los espermatozoides. En este caso, es necesario aumentar el ángulo, pero es importante evitar un ángulo demasiado pronunciado, ya que esto puede crear un efecto de corte cuando la pipeta de inyección penetra en el ovocito durante la ICSI, lo que puede provocar la degeneración del ovocito.



**Figura 3.** Ángulos recomendados de la micropipeta de holding (a la izquierda) y de inyección (a la derecha).

Antes de la ICSI, el cebado inicial o el equilibrio con el medio de cultivo evita que los gametos entren en contacto accidentalmente con el aire o el aceite más arriba en las micropipetas. Sin embargo, se recomienda la aspiración de PVP después del cebado con medio de cultivo para facilitar el control durante la aspiración e inyección de espermatozoides. La PVP es una solución de polímero sintético viscoso relativamente inerte que, por lo tanto, ralentiza la progresión del espermatozoide, pero el ovocito no puede descomponerlo y puede ser perjudicial para las membranas espermáticas (22). Su uso puede evitarse realizando ICSI usando solo medio de cultivo (23,24), aunque es técnicamente más exigente, especialmente para los novatos. Una alternativa fisiológica a la PVP para la ICSI es el hialuronato (25,26), que es un glicosaminoglicano, también denominado ácido hialurónico, que se produce de forma natural en el complejo ovocito-cúmulo (27,28). SpermSlow™ (CooperSurgical, Måløv, Dinamarca), una solución de hialuronato disponible comercialmente se ha diseñado específicamente para la manipulación y selección de espermatozoides.

La técnica ICSI es más eficaz si la motilidad y la concentración de la preparación de espermatozoides permiten la carga directa de la microgota de PVP o SpermSlow™ dentro de la placa ICSI. Por lo general, se agregan 1-5  $\mu$ L de preparación de espermatozoides al centro de la microgota usando una punta de pipeta estéril no tóxica, a una concentración de espermatozoides (p. ej.,  $10^6$ /mL en una proporción de 1:5 v:v) que permite facilidad de ubicación de los espermatozoides pero evita el hacinamiento. La ubicación y manipulación de los espermatozoides se logra más fácilmente utilizando la lente del objetivo de 20x (es decir, un aumento de 100-200x, dependiendo del aumento del ocular). Los espermatozoides que parecen más móviles y morfológicamente normales deben seleccionarse para ICSI, ya que estos parámetros se han correlacionado con la integridad del ADN espermático y la normalidad genética (29,30).

El aspecto más importante de la micromanipulación de espermatozoides para ICSI es la ruptura efectiva de la membrana espermática, ya que se sabe que esto es fundamental para la activación y fertilización exitosas del ovocito (31-33). El enfoque más fácil para esto es aspirar el espermatozoide elegido y realineararlo, expulsándolo en el fondo de la placa ICSI para que quede en ángulo recto con la pipeta de microinyección. Luego, la pipeta de inyección se puede arrastrar rápidamente a través de la mitad de la cola del espermatozoide, lejos de la pieza intermedia para evitar dañar el centriolo proximal, que el ovocito necesita para formar el huso mitótico bipolar (34). De hecho, si la cabeza del espermatozoide se disocia de la cola del espermatozoide durante la

manipulación, no se debe inyectar la cabeza del espermatozoide sola en el ovocito, ya que se sabe que esto provoca una embriogénesis deficiente (35). La ruptura exitosa de la membrana espermática se confirma por la pérdida de la motilidad de los espermatozoides y una cola en forma de V permanente. Los láseres de diodo sin contacto se han utilizado como medios más elaborados para la ruptura del plasmalema espermático (36,37), pero se desconoce si existen riesgos asociados con este enfoque, ya que el calor generado puede ser perjudicial para la función espermática. Una vez que se ha logrado la ruptura de la membrana espermática, el espermatozoide se puede aspirar primero en la punta de la pipeta de inyección y estabilizar la posición del espermatozoide dentro de la micropipeta antes de la inyección del ovocito.

Inmediatamente antes de la inyección de ovocitos, se debe impulsar suavemente el espermatozoide hacia la punta de la pipeta de inyección para minimizar el volumen de ooplasma aspirado posteriormente para lograr la ruptura del oolema, ya que esto se ha correlacionado inversamente con el resultado clínico después de la ICSI (38). Además, aunque el uso de PVP para ICSI no se ha asociado con ningún resultado adverso, parece prudente minimizar el volumen inyectado en el ovocito a <5 µl. También es aconsejable minimizar el riesgo de dañar el huso meiótico durante la ICSI eligiendo un sitio bien alejado del primer cuerpo polar (PBI), donde es más probable que se encuentre el huso meiótico, aunque la evidencia que sugiere que colocar el PBI a las 6 o a las 12 en punto hace alguna diferencia es controvertida (39-42).

### **Uso clínico**

Los datos mundiales más recientes sugieren que la ICSI se utiliza en el 69,3 % de todos los ciclos de FIV/ICSI (13), con las tasas de uso más bajas en Asia y las tasas más altas en América Latina y Oriente Medio; de hecho, algunos países de África, Europa y Oriente Medio informaron ciclos ICSI del 100 % (14). Sin embargo, las tasas globales de parto autólogo fresco por transferencia de embriones para FIV e ICSI fueron del 25,7 % y el 24,7 %, respectivamente (13).

En pacientes que presentaban infertilidad por factor masculino grave (oligozoospermia, astenozoospermia y teratozoospermia), los primeros informes demostraron claramente que la ICSI producía tasas altas de fertilización e implantación en comparación con la FIV (43,44). Además, en la infertilidad limitrofe o moderada por factor masculino, la ICSI todavía parecía otorgar tasas de fertilización más altas y minimizar el fracaso de la fertilización (45-47). Del mismo modo, en la infertilidad inexplicada, existen pruebas que demuestran que la ICSI produce tasas de fertilización fallida más bajas que la FIV (48-50). Como era de esperar, la ICSI también es beneficiosa después de una fertilización previa fallida o deficiente con FIV (51). Por otro lado, en la infertilidad sin factor masculino, la ICSI parece no ofrecer ningún beneficio sobre la FIV en las tasas de fertilización o de nacidos vivos (52-56). Además, no hay diferencia en el porcentaje de embriones euploides generados por ICSI y FIV en parejas de factores no masculinos (57,58).

En comparación con la ICSI, las pacientes que responden mal a la estimulación ovárica no parecen correr un mayor riesgo de resultados clínicos deficientes después de la FIV (59-61). Incluso en mujeres de edad materna avanzada, donde el número y la calidad de los ovocitos podrían plantear un problema, no parece haber diferencia en los resultados clínicos entre la FIV y la ICSI (62-65). De hecho, un gran estudio reciente informó una mayor tasa de nacidos vivos después de la FIV en parejas sin factores masculinos con edad materna avanzada (>35 años), aunque no se observaron diferencias significativas en otros resultados clínicos entre la FIV y la ICSI (66). Sin embargo, en mujeres con síndrome de ovario poliquístico o endometriosis, hay alguna evidencia que sugiere que la ICSI proporciona tasas de fertilización significativamente más altas y reduce la incidencia de fracaso de la fertilización (67,68).

### **En resumen**

El desarrollo de la técnica ICSI supuso un cambio radical en el alivio de la infertilidad por factor masculino grave y se ha convertido en el medio más común de inseminación en el laboratorio de reproducción asistida. La disponibilidad de equipos de micromanipulación de buena calidad y operadores de ICSI altamente calificados es esencial. En este sentido, la manipulación adecuada de los espermatozoides es fundamental para la aplicación exitosa de ICSI ya que la fertilización depende de la activación del ovocito por los factores activadores del ovocito citosólicos presentes en el citosol de los espermatozoides. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la ICSI no está indicada para todas las etiologías de infertilidad y, de hecho, la FIV puede ser un medio de

inseminación más apropiado para la infertilidad sin factor masculino en la mayoría de los casos (12,69).

## Inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI)

### Introducción

La selección natural de los espermatozoides se produce in vivo en varias uniones, como el cuello uterino, la unión útero-tubárica y, en última instancia, en la interfaz presentada por el complejo cúmulo-ovocitos. La FIV de rutina se beneficia de este último aspecto de la selección de espermatozoides in vitro, pero ICSI lo evita por completo. Esto es problemático ya que el practicante de ICSI selecciona los espermatozoides solo en función de la motilidad y la morfología, sin tener idea de si los espermatozoides seleccionados poseen ADN intacto o, de hecho, son genéticamente normales. Los métodos estándar e incluso más sofisticados de preparación de espermatozoides pueden reducir el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado (70), pero ninguno puede generar una población pura de espermatozoides sin daños en el ADN. Desafortunadamente, cualquier espermatozoide que contenga ADN fragmentado seleccionado involuntariamente para ICSI puede inducir daños en el ADN dentro de un ovocito fertilizado con éxito (71). De mayor importancia es el impacto que dicho daño en el ADN del esperma puede tener sobre la viabilidad del embrión, el mantenimiento del embarazo y la salud a largo plazo de cualquier recién nacido (71-73). Para identificar mejor los espermatozoides euploides con ADN intacto, se han desarrollado técnicas no invasivas que incluyen MSOME y PICSI (6,7).

La razón fisiológica de MSOME es que la ultramorfología de los espermatozoides puede estar correlacionada con la espermatogénesis y la madurez de los espermatozoides. Se pueden observar varias estructuras espermáticas con gran aumento para revelar cualquier anomalía (tabla 2), en particular dentro del acrosoma y el núcleo (74,75). Esto generalmente se logra mediante la combinación de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) con lentes de objetivo de alta potencia y aumento digital de la imagen resultante. Sin embargo, debido a la falta de ensayos controlados aleatorios (ECA) con el poder estadístico adecuado, no hay consenso con respecto a las indicaciones claras para la IMSI. Además, la base teórica de MSOME se complica por la apariencia fisiológica normal de las vacuolas durante la espermatogénesis, la capacitación y la reacción del acrosoma (76,77). Tal confusión y falta de pruebas científicas sólidas en beneficio de IMSI ha llevado a algunos a cuestionar su validez en la práctica clínica (78). Posteriormente, la clasificación de las vacuolas de la cabeza de los espermatozoides se revisó de acuerdo con su correlación con la integridad genómica, siendo más relevante su ubicación y profundidad dentro del núcleo que su tamaño o número (79).

La aplicación de la técnica IMSI requiere un sistema IMSI que comprende un microscopio invertido equipado con DIC, lentes de objetivo de aceite de 60x o 100x con una apertura numérica alta (NA), una plataforma de micromanipulación y un sistema de imágenes de video digital apropiado con software de análisis de imágenes (**Figura 4**).

**Tabla 2.** Anomalías ultraestructurales para selección vía MSOME (74).

Selection criteria	Abnormality
Acrosoma	Ausente Parcialmente ausente Vesiculado
Lámina post acrosomal	Ausente Vesiculada
Cuello	Abaxial Desordenado Gota citoplásmica

Mitocondria	Ausente Parcialmente ausente Desorganizada
Pieza principal del flagelo	Ausente Enrollado Roto Multiple Corto
Forma del núcleo  <b>Contenido de cromatina</b>	Oval pequeño Oval grande Estrecho (<2.9µm anchura) Ancho (>3.7µm anchura) Corto (<4.2µm longitud) Desordenado regionalmente Area vacuolar >4% del area nuclear total

Al combinar la ampliación del microscopio con la del chip de la cámara (dispositivo acoplado por carga; CCD), la dimensión diagonal del monitor y la ampliación de la imagen del software digital, es posible ampliar un espermatozoide móvil 6000-7000x (80,81) . Para lograr una buena resolución con ese aumento, la NA de la lente del objetivo debe ser alta y, dado que las burbujas dentro de las placas ICSI de plástico pueden interferir con la resolución óptica, se recomienda utilizar placas de Petri con fondo de vidrio (p. ej., Willco wells BV, Amsterdam, Países Bajos). El aumento de un sistema IMSI determinado puede comprobarse utilizando un micrómetro objetivo de 0,01 mm y calibrarse superponiendo un contorno de celuloide con el aumento validado de un espermatozoide que se sabe que es normal sobre el monitor. Algunos sistemas incorporan software específico de IMSI que permite la calibración e identificación automatizadas de espermatozoides normales (p. ej., IMSI Strict™ Leica).



**Figura 4.** Estación de trabajo de IMSI.

La preparación de espermatozoides y placa para IMSI es la misma que se emplea para ICSI, se agrega una muestra de la preparación de espermatozoides final a una microgota de PVP o SpermSlow™ cubierta con aceite mineral para lograr una concentración de espermatozoides dentro del rango,  $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ . La creación manual de pequeños canales que emanan de la microgota SpermSlow™ o PVP puede servir para atrapar espermatozoides móviles, lo que permite MSOME dentro de la placa IMSI (6). Alternativamente, la aspiración de espermatozoides en una pipeta de inyección puede facilitar la MSOME, ya que proporciona un mayor control de la motilidad de los espermatozoides y permite ver ambos lados de la cabeza del espermatozoide. Realizar MSOME a temperatura ambiente ayuda a reducir la motilidad de los espermatozoides y se ha sugerido que esto también evita la formación de vacuolas espermáticas que puede ocurrir después de una micromanipulación prolongada a temperaturas más altas (82). Los espermatozoides pueden considerarse normales siempre que cumplan los siguientes criterios MSOME (74):

1. Las dimensiones de la cabeza, el cuello y la cola están dentro del rango normal generalmente aceptado (83).
2. El núcleo aparece liso y simétricamente ovalado, que contiene cromatina homogénea desprovista de invaginaciones o extrusiones. Cualquier vacuola no debe ocupar más del 3% del área del núcleo.
3. El acrosoma y la lámina post-acrosomal son visibles sin vesículas presentes.
4. El cuello no posee gotitas citoplasmáticas.
5. La pieza intermedia contiene mitocondrias completamente formadas y bien organizadas.
6. El flagelo está desprovisto de anomalías.

Se ha sugerido un sistema de puntuación de la normalidad de la cabeza del espermatozoide mediante el cual se otorga un punto por las dimensiones normales de la cabeza del espermatozoide, un punto por la ausencia de vacuolas nucleares, que no sean una sola vacuola pequeña, y un punto por una base normal en la cabeza del espermatozoide (84) . Con este sistema de puntuación, una puntuación MSOME de 4 a 6 representa una buena calidad del esperma utilizando la siguiente fórmula:

$$(2 \times \text{puntaje de cabeza}) + (3 \times \text{puntaje de vacuola}) + \text{puntaje base.}$$

Muchos profesionales de MSOME han propuesto y adoptado otros grados de espermatozoides ultramorfológicos, en función del número y tamaño de las vacuolas nucleares presentes (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Sperm nuclear vacuole classification for selection via MSOME (85).

Grado de ultramorfología espermática	Número y tamaño de vacuolas
I	Ausencia de vacuolas
II	≤2 pequeñas vacuolas
III	>2 pequeñas vacuolas o ≥1 grandes vacuolas
IV	Grandes vacuolas + otra anomalía morfológica

Después de MSOME, los espermatozoides designados como normales pueden usarse para IMSI inmediatamente dentro de una placa con fondo de vidrio, siempre que se mantenga a 370 °C y no a temperatura ambiente, o después de transferirlos a una microgota de SpermSlow™ o PVP recubierta con aceite mineral dentro de un recipiente de plástico. Aunque algunos microscopios invertidos están equipados con condensadores que permiten cambiar rápidamente entre DIC a gran aumento y microscopía de contraste en relieve a menor aumento (15), IMSI, sin embargo, tarda el doble de tiempo que ICSI (86).

### Uso clínico

Los ECA iniciales de IMSI arrojaron resultados variados, uno demostró mayores tasas de implantación y embarazo clínico y el otro no encontró diferencias significativas en el resultado clínico entre ICSI e IMSI en pacientes no seleccionados (86,87). Metanálisis posteriores mostraron que IMSI aumentó las tasas de embarazo clínico, aunque la calidad de algunos de los datos se vio socavada por el bajo número de pacientes heterogéneos (78,81). Por otro lado, un gran ECA multicéntrico no logró mostrar ningún beneficio de la IMSI, independientemente de la madurez nuclear del esperma y el grado de fragmentación del ADN espermático (88). Sin embargo, un metaanálisis de IMSI en pacientes seleccionadas con fallas previas de implantación informó un aumento significativo en las tasas de implantación y embarazo clínico y una reducción en la tasa de aborto espontáneo (89). No obstante, las revisiones sistemáticas Cochrane han concluido que sigue existiendo incertidumbre sobre cualquier beneficio de la IMSI en las tasas de embarazo clínico, nacidos vivos y abortos espontáneos (90,91).

### En resumen

De forma aislada, la técnica ICSI carece de la metodología necesaria para identificar y seleccionar espermatozoides libres de daños en el ADN y errores genéticos. Por el contrario, IMSI es una técnica que combina MSOME con ICSI, lo que teóricamente aumenta la probabilidad de inyectar



ADN intacto, espermatozoides genéticamente normales. Sin embargo, la base teórica de MSOME se complica por la aparición de vacuolas durante los procesos fisiológicos normales, como la capacitación y la reacción del acrosoma. Además, la evidencia publicada sobre el beneficio percibido de IMSI es controvertida. Por lo tanto, todavía se requieren ECA multicéntricos grandes bien diseñados de IMSI antes de que pueda considerarse una práctica clínica habitual.

## **Selección de espermatozoides mediante unión al hialuronato: ICSI fisiológico mediante PICSI® y SpermSlow™**

### **Introducción**

En la práctica habitual de ICSI, los espermatozoides se seleccionan visualmente para la inyección en función de su motilidad (principalmente como marcador de viabilidad celular) y morfología. Sin embargo, este enfoque no refleja la integridad genómica del espermatozoide y la contribución paterna al cigoto. Se sabe, por ejemplo, que los espermatozoides morfológicamente normales de hombres con oligoastenoteratozoospermia tienen un riesgo elevado de aneuploidía (92). Para abordar esto, se han explorado técnicas adicionales para deseleccionar espermatozoides de baja calidad y maximizar la posibilidad de elegir un espermatozoide genéticamente sano, incluyendo IMSI (93) y enlace de hialuronato (7).

El hialuronato es un componente importante del cúmulo oóforo, así como del moco cervical y el líquido folicular (94) y los espermatozoides maduros transportan receptores de hialuronato (95) mientras que los espermatozoides inmaduros no se unen. Los espermatozoides maduros exhiben una alta integridad de la cadena de ADN (96), una frecuencia normal de aneuploidías cromosómicas y proporcionan una contribución paterna al cigoto comparable a la de los espermatozoides seleccionados por la zona pelúcida durante la fertilización natural (97). Es importante destacar que se observa una incidencia reducida de fragmentación del ADN en los espermatozoides que se unen al hialuronato en comparación con el semen puro o preparado (7,98). Esto es de particular importancia dada la posible asociación entre la fragmentación del ADN espermático y el deterioro del éxito reproductivo, especialmente debido a la pérdida temprana del embarazo (99-101).

La falta de fiabilidad de la selección basada en la motilidad y la morfología, además de la supuesta ventaja de anular la selección de espermatozoides dañados en el ADN, sugiere que debería haber beneficios clínicos al usar la unión de hialuronato como un procedimiento de detección adicional. Esto se puede lograr utilizando uno de dos métodos: la placa PICSI®, en la que se secan puntos de hialuronato en la superficie interna de una placa de cultivo, y SpermSlow™, que tiene una alta concentración de hialuronato en solución.

### **Técnicas**

#### *Dispositivo de selección de esperma PICSI®*

El dispositivo de selección de esperma PICSI® (CooperSurgical Fertility Solutions, Måløv, Dinamarca) es una placa de cultivo de poliestireno con tres puntos de hialuronano seco en la superficie interna, indicados por puntas de flecha grabadas en la superficie exterior inferior de la placa (**Figura 5**).



**Figura 5.** La placa PICSI muestra las puntas de flecha que indican la ubicación de los puntos de hialuronato.

El uso del dispositivo requiere que los puntos de hialuronato se rehidraten utilizando un medio de mantenimiento apropiado (normalmente tamponado con HEPES/MOPS) que contenga al menos 5 mg/ml de albúmina sérica humana. A continuación, la placa se inunda con aceite y se incuba mientras se llenan los puntos de hialuronato. Luego se pueden agregar espermatozoides preparados en el borde de la gota rehidratante. La unión de esperma se puede ver en cinco minutos en muchos casos, aunque algunos puntos pueden tardar hasta 30 minutos (ver Instrucciones de uso en <https://fertility.coopersurgical.com/dishes/picsi-dish-for-sperm-selection/>).

Se recomienda que los espermatozoides se agreguen en un volumen de medio igual o mayor que el que se usó para hidratar la gota para asegurar una rápida mezcla y entrega al punto de hialuronato. Sin embargo, puede ser ventajoso en la mayoría de los casos agregar los espermatozoides en la punta de las gotitas alargadas que cubren el punto de hialuronato de manera que los espermatozoides móviles deban migrar a través de la gotita mediana para alcanzar el punto de hialuronato. Esto imita el enfoque que se usa a menudo con PVP y actúa como un mecanismo de selección secundario y controla la velocidad a la que se unen los espermatozoides; esta es una consideración importante ya que la superpoblación del punto puede dificultar la selección y el manejo de los espermatozoides individuales. Además, el volumen de suspensión de espermatozoides que se agrega a cada gota se puede variar, de modo que se produzcan cantidades diferentes de espermatozoides; esto permite que los espermatozoides se recuperen primero de la gota con la mayor cantidad de espermatozoides agregados, luego pasar a la segunda más y finalmente la gota con la menor cantidad de espermatozoides. De esta manera, los espermatozoides se pueden recolectar durante un período de tiempo prolongado antes de que el micropunto se congestione. Esto se demuestra en el video del fabricante en <https://www.youtube.com/watch?v=bzF4rv-bDWQ> (también disponible en la página web del producto en <https://fertility.coopersurgical.com/dishes/picsi-dish-for-sperm-selection/>).

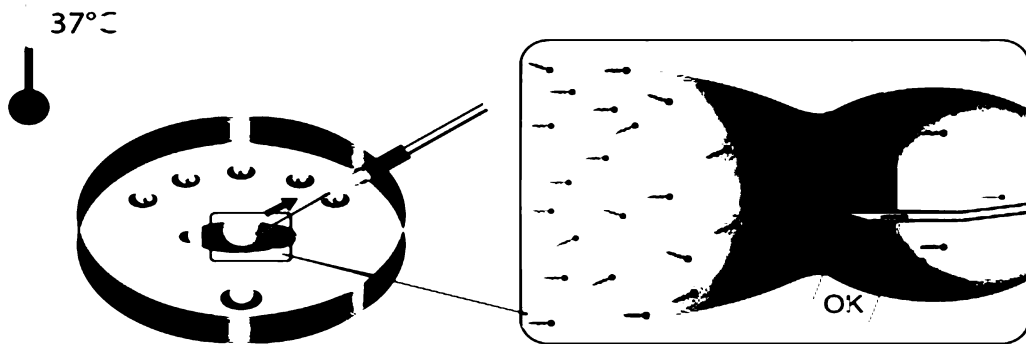
Las instrucciones de uso indican que se puede lograr una unión óptima cuando la placa PICSi® se prepara y se usa a temperaturas inferiores a 30 °C, ya que la velocidad del esperma puede superar la fuerza de unión a temperaturas más altas. En el entorno clínico, sin embargo, los laboratorios configurarán las etapas calentadas de los sistemas de micromanipulación para mantener los platos a 37°C; en este escenario, la unión podría reducirse, pero el fabricante afirma que la placa PICSi® normalmente alcanzará los 33 °C cuando esté en una pletina calefactada pero que "a 33 °C o incluso a 37 °C, muchos espermatozoides unidos permanecerán disponibles para la selección".

En la práctica, la recolección de los espermatozoides unidos a hialuronato se realiza fácilmente colocando la punta de la micropipeta ICSI junto a los espermatozoides unidos y succionando suavemente el líquido en la pipeta, atrayendo el espermatozoide. Los espermatozoides para inyección también deben evaluarse sobre la base de la morfología antes de que se rompa la membrana de la cola, como en la ICSI de rutina.

### *SpermSlow™*

SpermSlow™ es un medio semiviscoso con una alta concentración de hialuronato. Aunque a veces se usa simplemente como una alternativa a la PVP, SpermSlow™ permite la selección de espermatozoides sanos y maduros por su capacidad para unirse con hialuronato de la misma manera que la placa PICSi®. Sin embargo, el hialuronato está en solución (formando una red tridimensional) en lugar de recubrir la superficie del plato, por lo que los receptores que expresan los espermatozoides se unen al hialuronato y pierden su motilidad progresiva. Esto significa que la selección es un poco contraria a la intuición, ya que son los espermatozoides que nadan libremente los que se ignoran y los que se vuelven menos móviles los que se eligen.

Después de dispensar las gotas de retención de ovocitos, la selección de espermatozoides se facilita mediante la dispensación de una gota de SpermSlow™ y una gota de la suspensión final de espermatozoides preparada conectada con una gota puente de medio de manipulación tamponado en la placa ICSI estándar del laboratorio antes de inundarla con aceite. La gota puente permite la selección de espermatozoides en función de la motilidad, pero también permite una fácil observación de la unión en la interfaz entre la gota puente y SpermSlow™ (figura 6). En los casos en que la motilidad o el número de espermatozoides sean extremadamente deficientes, se puede omitir la gota puente y el borde de la gota de suspensión de esperma simplemente se mezcla con la gota SpermSlow™.



**Figura 6.** La configuración utilizada para SpermSlow™ que muestra la interfaz con la gota puente donde se seleccionan los espermatozoides.

Esto se demuestra en el video del fabricante en <https://www.youtube.com/watch?v=TBD1yIwvWkw&t=119s>

(también disponible en la página web del producto en [https://fertility.coopersurgical.com/art\\_media/spermslow/](https://fertility.coopersurgical.com/art_media/spermslow/)).

### Uso clínico

La selección basada en la unión al hialuronato de espermatozoides más maduros y genéticamente competentes para su inyección en el ovocito debería producir mejores resultados. También sería razonable suponer que las dos técnicas seleccionan los espermatozoides de la misma manera y, por lo tanto, deberían dar los mismos resultados. De hecho, Parmegiani et al. (102) realizaron un ensayo aleatorio prospectivo que demostró ese hecho.

Los criterios de valoración embriológicos muestran resultados variables cuando se utilizan placas PICSi® o SpermSlow™. Algunos estudios más pequeños han sugerido tasas más altas de fertilización cuando se usa la selección de unión a hialuronato (HABS) (103-105) aunque este no es un hallazgo universal (98,106). Un pequeño estudio de con ovocitos hermanos asignados al azar a la selección de espermatozoides con SpermSlow™ o en PVP sugirió una fertilización anormal más baja y una fertilización normal más alta (107), pero el desarrollo del embrión hasta el día 3 no se vio afectado. Por el contrario, Parmegiani et al (7) encontraron una mayor proporción de embriones de grado superior. Alegre et al (108) encontraron mejoras significativas en la calidad embrionaria usando ICSI fisiológica; sin embargo, el mismo grupo (109) informó más tarde que no hubo diferencias en la calidad embrionaria entre ICSI fisiológica y estándar, aunque aún sugirió que la ICSI fisiológica es ventajosa en términos de tasas acumuladas de embarazo.

De manera similar, los estudios son inconsistentes en términos de demostrar una mejor tasa de implantación o embarazo y algunos sugieren mejores resultados (7,110-115) aunque no siempre alcanzan significación estadística. Majumdar y Majumdar (106) observaron específicamente a pacientes con infertilidad inexplicable con una tendencia hacia mejores tasas de embarazo clínico y menores pérdidas de embarazo, aunque el número de pacientes fue relativamente bajo. En contraste con un estudio anterior (104) que no encontró mejoras en los resultados utilizando ICSI fisiológica para pacientes con infertilidad por factor masculino, otro grupo (114) informó mejores tasas de embarazo clínico y sugirió que las pacientes teratozoospermicas se beneficiaron más.

Quizás la asociación más interesante es entre la unión de hialuronato y la pérdida temprana del embarazo. Dados los datos que vinculan la fragmentación del ADN espermático y el aborto espontáneo (100), uno podría sospechar que la aparente desección de los espermatozoides dañados en el ADN mediante la unión de hialuronato (7) podría reducir el riesgo de pérdida temprana del embarazo. Un estudio multicéntrico de Worrilow y colaboradores (111) en el que participaron 802 pacientes observó tasas de implantación más altas en el grupo de ICSI fisiológica, pero no fueron estadísticamente significativas; el estudio se detuvo prematuramente y, por lo tanto, es imposible saber si un estudio totalmente potenciado lo habría confirmado. Sin

embargo, la tasa de abortos se redujo notablemente cuando se utilizó ICSI fisiológica en parejas de hombres con bajas proporciones (<65 %) de espermatozoides que se unían al hialuronato, ya sea en el semen inicial sin procesar (3,3 % frente a 15,1 %;  $p < 0,05$ ) o en la preparación final de semen (0% v 18,5%;  $p < 0,05$ ). Los autores concluyeron que determinar el porcentaje de espermatozoides que se unen al hialuronato y luego ofrecer ICSI fisiológica a aquellos con un 65 % o menos podría proporcionar un enfoque equilibrado para usar juiciosamente la unión del hialuronato. En un estudio mucho más grande en el Reino Unido (ensayo HABSelect; (116)), 2772 parejas, que presentaban una amplia gama de etiologías, fueron asignadas al azar a ICSI fisiológica o estándar; el criterio principal de valoración utilizado fue la tasa de nacidos vivos a término que, aunque ligeramente superior, no mejoró significativamente (27,4 % frente a 25,2 %;  $p = 0,18$ ). Por el contrario, la tasa de aborto espontáneo se redujo significativamente (4,3 % frente a 7,0 %;  $p = 0,003$ ). A diferencia del estudio Worrlow, en el que se observó una tasa de aborto espontáneo reducida solo en parejas de hombres con una unión de hialuronato baja (<65 %), el estudio HABSelect encontró que la ICSI fisiológica redujo la tasa de aborto espontáneo independientemente de la puntuación de unión de hialuronato del hombre (117).

### En resumen

La capacidad de los espermatozoides para unirse con hialuronato está asociada con la madurez y una mayor integridad genética. Esto se refleja en los niveles reducidos de fragmentación del ADN cuando se emplean métodos de selección de espermatozoides que utilizan la unión de hialuronato (7). El hecho de que esto no resulte consistentemente en mejores resultados clínicos es evidente, aunque algunos informes son ciertamente alentadores. Los informes de mejores resultados en grupos seleccionados (por ejemplo, casos de factor masculino; (114)) pueden indicar que la selección de pacientes es clave. Lógicamente, esto podría basarse no solo en la etiología, sino también en una prueba de detección para identificar a los hombres con niveles más bajos de unión al hialuronato en el esperma, como lo demostraron Worrlow et al (111), aunque esto no se reprodujo en el estudio HABSelect (117). Sin embargo, parece haber un impacto positivo en la reducción de abortos espontáneos, posiblemente asociado con la desección de espermatozoides con ADN dañado. El análisis mecánico realizado como parte del gran estudio HABSelect concluyó que "PICSI protegía contra el aborto espontáneo y que la edad femenina era el indicador más fuerte de la eficacia de PICSI en este sentido".

### Conclusión

Las principales técnicas de micromanipulación de esperma actualmente en uso regular incluyen ICSI, IMSI e ICSI fisiológico (con o sin SpermSlow™). Sin embargo, solo la ICSI puede considerarse una técnica de rutina, ya que se ha utilizado para aliviar la infertilidad por factor masculino grave durante los últimos 30 años y se ha convertido en la técnica de inseminación predominante realizada en todo el mundo. Por el contrario, la IMSI y la ICSI fisiológica están indicadas en los casos en los que existe un mayor riesgo de fallo de implantación o aborto espontáneo debido a una elevada fragmentación del ADN espermático. En este sentido, existe muy buena evidencia de que la ICSI fisiológica reduce significativamente las tasas de aborto espontáneo. Se han realizado esfuerzos para desarrollar aún más la técnica ICSI a través de piezo-ICSI e ICSI robótica, pero estas técnicas aún no se han aplicado universalmente dentro del laboratorio de reproducción asistida, aunque son muy prometedoras para mejorar la eficiencia de la micromanipulación de esperma.

### Referencias

1. Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril.* 1987; DOI: 10.1016/s0015-0282(16)59478-3
2. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril.* 1988; DOI: 10.1016/s0015-0282(16)59893-8

3. Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, Al-Hassan S. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*. 1995; DOI: 10.1016/s0140-6736(95)90149-3
4. Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med*. 1995; DOI: 10.1056/NEJM199508243330819
5. Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I. Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet*. 1998; DOI: 10.1016/S0140-6736(05)79121-2
6. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *New Engl J Med*. 2001; DOI: 10.1056/NEJM200110043451416
7. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiological ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fert Steril*. 2010; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.033
8. Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VH. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet*. 1988; DOI: 10.1016/s0140-6736(88)92433-6
9. Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia. *Fertil Steril*. 1991; DOI: 10.1016/s0015-0282(16)54726-8
10. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992; DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-f
11. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993; DOI: 10.1016/0140-6736(93)92217-h
12. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor indications: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.032
13. Adamson G. International committee for monitoring assisted reproductive technologies (ICMART) preliminary world report on ART, 2017. *Hum Reprod*. 2021;36(Suppl 1):O-043.
14. Banker M, Dyer S, Chambers GM, Ishihara O, Kupka M, de Mouzon J, Zegers-Hochschild F, Adamson G. International committee for monitoring assisted reproductive technologies (ICMART): world report on assisted reproductive technologies, 2013. *Fertil Steril*. 2021; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.039
15. Fleming SD, King RS. *Micromanipulation in Assisted Conception: A user's manual and troubleshooting guide*. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
16. Fleming SD. Micromanipulation, microinjection microscopes and systems for ICSI. In: Palermo GD, Nagy ZP, editors. *Manual of Intracytoplasmic Sperm Injection in Human Assisted Reproduction: with other advanced micromanipulation techniques to edit the genetic and*

- cytoplasmic content of the oocyte. Cambridge: Cambridge University Press; 2021. pp. 114-28.
17. Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod.* 1999; DOI: 10.1093/humrep/14.8.2015
  18. Boomsma CM, Cochlen BJ, Farquar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019; DOI: 10.1002/14651858.CD004507.pub4
  19. Soupart P, Strong PA. Ultrastructural observations on polyspermic penetration of zona pellucida-free human oocytes inseminated in vitro. *Fertil Steril.* 1975;26:523-37.
  20. Yanagimachi R. Male gamete contributions to the embryo. *Ann NY Acad Sci.* 2005; DOI: 10.1196/annals.1336.022
  21. Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum Reprod.* 1996; DOI: 10.1093/humrep/11.3.540
  22. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Gambera L, Piomboni P. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). *Hum Reprod.* 1998; DOI: 10.1093/humrep/13.1.120
  23. Jean M, Barnere P, Mirallie S. Intracytoplasmic sperm injection without polyvinylpyrrolidone: an essential precaution? *Hum Reprod.* 1996; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019099
  24. Hlinka D, Herman M, Vesela J, Hredzak R, Horvath S, Pacin J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum Reprod.* 1998; DOI: 10.1093/humrep/13.7.1922
  25. Barak Y, Menezo Y, Veiga A, Elder K. A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fertil.* 2001; DOI: 10.1080/1464727012000199371
  26. Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellstrom H, Urman B, Holmes PV. An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Hum Reprod.* 2003; DOI: 10.1093/humrep/deg385
  27. Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature.* 1979; DOI: 10.1038/281483a0
  28. Tesarik J, Kopecny V. Late preovulatory synthesis of proteoglycans by the human oocyte and cumulus cells and their secretion into the oocyte-cumulus-complex extracellular matrices. *Histochemistry.* 1986; DOI: 10.1007/BF00508435
  29. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21:33-44.
  30. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod.* 2000; DOI: 10.1093/humrep/15.2.351

31. Dozortsev D, De Sutter P, Dhont M. Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138406
32. Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM, Matthews CD. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138392
33. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138537
34. Sathananthan AH, Ratnam SS, Ng SC, Tarin JJ, Gianaroli L, Trounson A. The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod.* 1996; DOI: 10.1093/humrep/11.2.345
35. Moomjy M, Colombero LT, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD. Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. *Mol Hum Reprod.* 1999; DOI: 10.1093/molehr/5.9.836
36. Montag M, Rink K, Delacretaz G, van der Ven H. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; DOI: 10.1093/humrep/15.4.846
37. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Hartl J, Tews G. Laser assisted immobilization of spermatozoa prior to intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod.* 2001; DOI: 10.1093/humrep/16.12.2628
38. Dumoulin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, van Wissen LC, Geraedts JP, Evers JL. Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod.* 2001; DOI: 10.1093/humrep/16.2.306
39. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem AC. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod.* 1995; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135881
40. Van Der Westerlaken LA, Helmerhorst FM, Hermans J, Naaktgeboren N. Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate. *Hum Reprod.* 1999; DOI: 10.1093/humrep/14.10.2565
41. Stoddart NR, Fleming SD. Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o'clock during ICSI does not affect clinical outcome. *Hum Reprod.* 2000; DOI: 10.1093/humrep/15.7.1580
42. Woodward BJ, Montgomery SJ, Hartshorne GM, Campbell KH, Kennedy R. Spindle position assessment prior to ICSI does not benefit fertilization or embryo quality. *Reprod Biomed Online.* 2008; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60579-2
43. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris L, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993; DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138192
44. Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional in-vitro

- fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1999; DOI: 10.1093/humrep/14.9.2313
45. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga J-M, Chouraqi A, Tesquier T, Serkine AM. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod.* 2002; DOI: 10.1093/humrep/17.2.362
  46. Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril.* 2002; DOI: 10.1016/s0015-0282(02)03377-0
  47. Van Der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, Helmerhorst FM. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil Steril.* 2006; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.077
  48. Ruiz A, Remohi J, Minguez Y, Guanes PP, Simon C, Pellicer A. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 1997; DOI: 10.1016/s0015-0282(97)81497-5
  49. Bungum L, Bungum M, Humaidan P, Yding Andersen C. A strategy for treatment of couples with unexplained infertility who failed to conceive after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online.* 2004; **8** DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61107-8
  50. Johnson LNC, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.038
  51. Van Der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, Naaktgeboren N. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.08.029
  52. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Braude P, Kennedy R, Rutherford A, Hartshorne G, Templeton A. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001; DOI: 10.1016/s0140-6736(00)05179-5
  53. Chambers GM, Wand H, Macaldowie A, Chapman MG, Farquhar CM, Bowman M, Molloy D, Ledger W. Population trends and live birth rates associated with common ART treatment strategies. *Hum Reprod.* 2016; DOI: 10.1093/humrep/dew232
  54. Li Z, Wang AY, Bowman M, Hammarberg K, Farquhar C, Johnson L, Safi N, Sullivan EA. ICSI does not increase the cumulative live birth rate in non-male factor infertility. *Hum Reprod.* 2018; DOI: 10.1093/humrep/dey118
  55. Abbas AM, Hussein RS, Elsenity MA, Samaha II, El Etriby KA, Abd El-Ghany MF, Khalifa MA, Abdelrheem SS, Ahmed AA, Khodry MM. Higher clinical pregnancy rate with in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in treatment of non-male factor infertility: Systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020; DOI: 10.1016/j.jogoh.2020.101706



56. Geng T, Cheng L, Ge C, Zhang Y. The effect of ICSI in infertility couples with non-male factor: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2020; DOI: 10.1007/s10815-020-01970-9
57. Palmerola KL, Vitez SF, Amrane S, Fischer CP, Forman EJ. Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *J Assist Reprod Genet.* 2019; DOI: 10.1007/s10815-018-1347-6
58. De Munck N, El Khatib I, Abdala A, El-Damen A, Bayram A, Arnanz A, Melado L, Lawrenz B, Fatemi HM. Intracytoplasmic sperm injection is not superior to conventional IVF in couples with non-male factor infertility and preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A). *Hum Reprod.* 2020; DOI: 10.1093/humrep/deaa002
59. Luna M, Bigelow C, Duke M, Ruman J, Sandler B, Grunfeld L, Copperman AB. Should ICSI be recommended routinely in patients with four or fewer oocytes retrieved? *J Assist Reprod Genet.* 2011; DOI: 10.1007/s10815-011-9614-9
60. Sfontouris IA, Kolibianakis EM, Lainas GT, Navaratnarajah R, Tarlatzis BC, Lainas TG. Live birth rates using conventional in vitro fertilization compared to intracytoplasmic sperm injection in Bologna poor responders with a single oocyte retrieved. *J Assist Reprod Genet.* 2015; DOI: 10.1007/s10815-015-0459-5
61. Drakopoulos P, Garcia-Velasco J, Bosch E, Blockeel C, de Vos M, Santos-Ribeiro S, Makrigiannakis A, Tournaye H, Polyzos NP. ICSI does not offer any benefit over conventional IVF across different ovarian response categories in non-male factor infertility: a European multicenter analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2019; DOI: 10.1007/s10815-019-01563-1
62. Tannus S, Son W-Y, Gilman A, Younes G, Shavit T, Dahan M-H. The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age. *Hum Reprod.* 2017; DOI: 10.1093/humrep/dew298
63. Gennarelli G, Carosso A, Canosa S, Filippini C, Cesarano S, Scarafia C, Brunod N, Revelli A, Benedetto C. ICSI versus conventional IVF in women aged 40 years or more and unexplained infertility: A retrospective evaluation of 685 cycles with propensity score model. *J Clin Med.* 2019; DOI: 10.3390/jcm8101694
64. Sunderam SL, Boulet S, Kawwass JF, Kissin DM. Comparing fertilization rates from intracytoplasmic sperm injection to conventional in vitro fertilization among women of advanced age with non-male factor infertility: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2020; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.035
65. Haas J, Miller TE, Nahum R, Aizer A, Kirshenbaum M, Zilberberg E, Lebovitz O, Orvieto R. The role of ICSI vs. conventional IVF for patients with advanced maternal age – a randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet.* 2021; DOI: 10.1007/s10815-020-01990-5
66. McPherson NO, Vincent AD, Pacella-Ince L, Tremellon K. Comparison of in vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection on live birth rates in couples with non-male factor infertility and advanced maternal age. *J Assist Reprod Genet.* 2021; DOI: 10.1007/s10815-020-02026-8
67. Hwang J-L, Seow K-M, Lin Y-H, Hsieh B-C, Huang L-W, Chen H-J, Huang S-C, Chen C-Y, Chen P-H, Tzeng C-R. IVF versus ICSI in sibling oocytes

- from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2005; DOI: 10.1093/humrep/deh786
68. Komsky-Elbaz A, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Kasterstein E, Komarovsky D, Ron-El R, Ben-Ami I. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes from couples with endometriosis and normozoospermic semen. *J Assist Reprod Genet.* 2013; DOI: 10.1007/s10815-012-9922-8
  69. Fleming S, Chapman S, Ong K, Crittenden J, Smith H. ICSI is neither a necessary nor optimal mode of insemination for most IVF patients. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 2009; 49(suppl S1):A7-8.
  70. Fleming SD, Ilad RS, Griffin A-MG, Wu Y, Ong KJ, Smith HC, Aitken RJ. Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod.* 2008; DOI: 10.1093/humrep/den330
  71. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 1999; DOI: 10.1530/jrf.0.1150001
  72. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod.* 2003; DOI: 10.1093/humrep/deg202
  73. Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; DOI: 10.1007/s00441-005-1097-5
  74. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002; DOI: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02595.x
  75. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online.* 2008; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60307-0
  76. Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dalleac A, Menezo Y. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Hum Reprod.* 2012; DOI: 10.1093/humrep/des266
  77. Tanaka A, Nagayoshi M, Tanaka I, Kusunoki H. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertil Steril.* 2012; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.034
  78. De Vos A, Polyzos NP, Verheyen G, Tournaye H. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a critical and evidence-based review. *Basic Clin Androl.* 2013; DOI: 10.1186/2051-4190-23-10
  79. Berkovitz A, Dekel Y, Goldstein R, Bsoul S, Machluf Y, Bercovich D. The significance of human spermatozoa vacuoles can be elucidated by a novel procedure of array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 2018; DOI: 10.1093/humrep/dey019
  80. Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online.* 2009; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60283-0
  81. Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cassia Savio Figueira R, Iaconelli A, Borges E. Intracytoplasmic sperm injection

- outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010; DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.05.017
82. Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by *in vitro* incubation at 37°C? *Fertil Steril*. 2007; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.01.069
  83. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 6th ed. Geneva: WHO Press; 2021.
  84. Knez K, Zorn B, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: A comparative prospective randomized study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011; DOI: 10.1186/1477-7827-9-123
  85. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60308-2
  86. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2011; DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.11.003
  87. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2008; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60150-2
  88. Leandri RD, Gachet A, Pfeffer J, Celebi C, Rives N, Carre-Pigeon F, Kulski O, Mitchell V, Parinaud J. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) beneficial in the first ART cycle? A multicentric randomized controlled trial. *Andrology*. 2013; DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00104.x
  89. Setti AS, Braga DPAF, Figueira RCS, Iaconelli A, Borges E. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; DOI: 10.1016/j.ejogrb.2014.10.008
  90. Teixeira DM, Barbosa MAP, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Ferring N, Nastri CO, Martins WP. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; DOI: 10.1002/14651858.CD010167.pub2
  91. Teixeira DM, Miyague AH, Barbosa MA, Navarro PA, Raine-Ferring N, Nastri CO, Martins WP. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; DOI: 10.1002/14651858.CD010167.pub3
  92. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod*. 2004; DOI: 10.1093/humrep/deh438

93. Souza Setti A, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A, Aoki T, Borges E. Twelve years of MSOME and IMSI: a review. *Reprod Biomed Online*. 2013; DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.06.011
94. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2003; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61891-3
95. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003; DOI: 10.1016/s0015-0282(03)00402-3
96. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl*. 2010; DOI: 10.2164/jandrol.109.008912
97. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.05.068
98. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A. Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online*. 2009; DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60282-9
99. Sakkas D, Alvaraz JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046
100. Tomlinson M, Lewis S, Morroll D. Sperm quality and its relationship to natural and assisted conception: British Fertility Society guidelines for practice. *Hum Fertil*. 2013; DOI: 10.3109/14647273.2013.807522
101. McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2019; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.003
102. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. SpermSlow: a prospective, randomized trial. *Fert Steril*. 2012; DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.043
103. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2008; DOI: 10.1007/s10815-008-9223-4
104. Sauerbrun-Cutler M-T, Ozensoy S, Vega M, Keltz M. Does PICSi offer an advantage over ICSI in ART for patients with male factor? *Fertil Steril*. 2013; 100(suppl. 3):S516.
105. Saymé N, Sollmann K, Maas D, Krebs T. The effect of hyaluronic acid coated pertri dish sperm selection (PICSi) on fertilisation rate, embryo development and pregnancy rate and relationship to sperm quality in an IVF program *Fertil Steril*. 2013; 100(suppl. 3):S529.
106. Majumdar G & Majumdar A. A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained

- infertility having normal semen parameters. *J Assist Reprod Genet.* 2013; DOI: 10.1007/s10815-013-0108-9
107. Liu Y, Feenan K, Chapple V, Roberts P, Matson P. Intracytoplasmic sperm injection using hyaluronic acid or polyvinylpyrrolidone: a time-lapse sibling oocyte study. *Hum Fertil.* 2019; DOI: 10.1080/14647273.2017.1366077
  108. Alegre L, Garrido N, Romero J, Palma A, Remohi Gimenez J, Meseguer M. Embryo quality is improved by PICSI sperm selection. a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2016; 106(suppl. 3):e307.
  109. Alegre L, Hervas I, Arnal L, Vilorio T, Remohi J, Meseguer M. Sperm selection with hyaluronic acid (PICSI) improves efficiency of IVF cycles. *Fertil Steril.* 2019; 112(suppl. 3):e283-4.
  110. Azevedo A, Albuquerque M, Miyasato F, Fujihara L, Aranki J, Albuquerque L. Comparison conventional PVP-ICSI vs. HA-PICSI: is there significant improvement in pregnancy rate? *Fertil Steril.* 2013; 100(suppl. 3):S530.
  111. Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes--multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2013; DOI: 10.1093/humrep/des417
  112. Mokanszki A, Tothne EV, Bodnar B, Tandor Z, Molnar Z, Jakab A, Ujfalusi A, Olah E. Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs ICSI? *Syst Biol Reprod Med.* 2014; DOI: 10.3109/19396368.2014.948102
  113. Alegre L, Garrido N, Munoz M, de los Santos M, Remohi Gimenez J, Meseguer M. Sperm selection with hyaluronic acid (PICSI) improves LBR in IVF treatments. *Fertil Steril.* 2017; 108(suppl. 3):e130.
  114. Erberelli RF, Salgado RM, Mendes Pereira DH, Wolff P. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility. *JBRA Assisted Reproduction.* 2017; DOI: 10.5935/1518-0557.20170002
  115. Hasanen E, Elqusi K, El Tanbouly S, El Ghafar Hussin A, Al Khadr H, Zaki H, Henkel R, Agarwal A. PICSI vs. MACS for abnormal sperm DNA fragmentation ICSI cases: a prospective randomized trial. *J Assist Reprod Genet.* 2020; DOI: 10.1007/s10815-020-01913-4
  116. Miller D, Pavitt S, Sharma V, Forbes G, Hooper R, Bhattacharya S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A, Lewis S, Cutting R, Brison D, Pacey A. Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): a parallel, two-group, randomised trial. *Lancet.* 2019; DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32989-1
  117. Kirkman-Brown J, Pavitt S, Khalaf Y, Lewis S, Hooper R, Bhattacharya S, Coomarasamy A, Sharma V, Brison D, Forbes G, West R, Pacey A, Brian K, Cutting R, Bolton V, Miller D. Sperm selection for assisted reproduction by prior hyaluronan binding: the HABSelect RCT. Efficacy and Mechanism Evaluation. 2019; DOI: 10.3310/eme06010

# VITRIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS: EFECTO DE CRIOPROTECTORES Y MÉTODOS DE ENFRIAMIENTO EN LA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA

Mengying Wang<sup>1</sup>

Evgenia Isachenko<sup>1</sup>

Gohar Rahimi<sup>1</sup>

Pradeep Kumar<sup>1,2</sup>

Peter Mallmann<sup>1</sup>

Vladimir Isachenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Materno Universitario, Universidad de Colonia, Colonia, Alemania. <sup>2</sup>Instituto Central de Investigación sobre Búfalos (ICAR), India.

Autor Corresponsal: Dr. Vladimir Isachenko. Correo electrónico: [vladimir.isachenko@uk-koeln.de](mailto:vladimir.isachenko@uk-koeln.de)

## Introducción

La criopreservación es un procedimiento para congelar varios tipos de células y tejidos, documentado desde principios del siglo XIX. Su uso en la crioconservación de espermatozoides humanos en presencia de crioprotectores fue el primero publicado a finales de la década de 1950. Desde aquellos días, la criopreservación de semen fue ampliamente utilizada en los laboratorios de técnicas de reproducción asistida (TRA) y Andrología. Sus aplicaciones prácticas en humanos incluyen varias posibilidades, como el tratamiento de la infertilidad, la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y el uso de muestras de espermatozoides epididimarios y testiculares congelados en tratamientos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en pacientes con azoospermia obstructiva y no obstructiva.

Se han creado varios protocolos de criopreservación buscando el mejor resultado para recuperar células sin daños criogénicos y parámetros funcionales adecuados, como la motilidad de los espermatozoides, la viabilidad y el daño del ADN. Además, los métodos convencionales de congelación lenta de espermatozoides humanos se utilizan ampliamente en TRA, pero no se han logrado las expectativas deseadas. En general, estas metodologías promueven la deshidratación del agua intracelular a través de agentes crioprotectores (CPA) para evitar la formación de hielo y el daño celular físico. Sin embargo, estos procedimientos implican una mayor concentración de medios de congelación, lo que desencadena la posibilidad de choque osmótico, formación de hielo intracelular y extracelular, lo que lleva al daño mecánico y la muerte celular.

Por lo tanto, la vitrificación de espermatozoides se ha propuesto como un método alternativo que conduce a la formación de una etapa de vidrio que evita la formación de cristales de hielo, en lugar de procedimientos que intentan controlar una formación reducida de hielo como los métodos de congelación lenta (1). En nuestro grupo, confirmamos que la vitrificación, libre de crioprotector permeable, preserva mejor la calidad de los espermatozoides que la congelación lenta (2). El método de vitrificación presentó ventajas en términos de tasa de recuperación de espermatozoides, integridad del acrosoma y fragmentación del ADN en comparación con la congelación lenta (1,3,4).

La técnica de vitrificación se basa en el enfriamiento ultrarrápido de espermatozoides humanos directamente en nitrógeno líquido con o sin el uso de un CPA permeable. En este sentido, se previene la formación de cristales de hielo intracelulares letales y los efectos nocivos de la alta concentración de sal, reduciendo el daño en las funciones de los espermatozoides (2,5,6), haciendo que este procedimiento sea mucho menos laborioso, más rápido y más simple en su aplicación que la congelación convencional.

Más importante aún, muchos estudios que utilizaron la misma muestra en el mismo estudio compararon la eficacia de los dos métodos para determinar si la vitrificación es mejor que la congelación convencional (**Tabla**) (4,7-21). La **Tabla** resumida mostró que la vitrificación conserva mejor la función de los espermatozoides, como la motilidad, la mitocondria, el acrosoma y la integridad de la membrana plasmática, en comparación con la congelación convencional; Incluso con resultados comparables, el método de vitrificación fue mucho más rápido, más simple, de menor toxicidad y rentable.

## Tabla

Estudios	Criterio incluido	Vitrificación		Congelamiento convencional		Comparación de resultados
		Protocolo	Medio	Protocolo	Medio	
Nawroth et al., 2002	N	“Loop” de cobre, pajueta. Inmersión en N2 líquido	Permeable Libre de CPA (con o sin)	Pajueta de 0,25 mL. TA 10 min, 22 °C~4 °C a 5 °C/min; 4 °C~-30 °C a 10 °C/min; -30 °C~-140 °C a 20 °C/min.	Glicerol en Test-egg-yolk-buffer	Mayor motilidad en vitrificación; No hay diferencia en la morfología.
Isachenko et al., 2004	N	“loop” de cobre” (20 µl). Inmersión en el N2 Líquido	Con/Sin medio de congelamiento TEYG)	Pajueta de inseminación de 0,25mL, congelador programable	Medio de congelación TEYG (Test± egg yolk ± glicerol)	Mayor motilidad en vitrificación; resultados comparables en la integridad del ADN
Chang et al., 2008	DS	Inmersión en N2 líquido	Buffer TYB	Congelador Biológico	Buffer TYB	No hay diferencia en la motilidad o la fragmentación del ADN.
Vutyavanich et al., 2010	N	Pajueta de 0,25 mL, 4 °C 10 min. Inmersión en N2 líquido	HSA+ trealose 100mmol + glicerol 10%	Pajueta de 0,25 mL, TA 10 min. 20 °C ~5 °C a 1 °C/min; -5 °C ~-85 °C a 10 °C/min.	Medio Comercial de Congelamiento	Motilidad y criosobrevivencia superior en vitrificación. No hay diferencia en la morfología o la integridad del ADN.
Moskovtsev et al., 2012	I	Libre de crioprotector permeable	Medio G-IVF	Vapor de congelamiento (poco claro)	Medio Comercial	La vitrificación resultó en una mayor motilidad y motilidad progresiva.

Isachenko et al., 2012	N	Empaquetado en pajuelas (por capilaridad) (10µl). Inmersión en N2 líquido	HTF + HAS + sacarosa 0,25M	Pajuelas colocadas por encima de 10cm, -80 °C vapor 30min.	Medio de congelamiento TYB	Mejor motilidad, integridad de la membrana plasmática e integridad del acrosoma.
Agha-Rahimi et al., 2014	N	Gota de 30 µl. Inmersión en N2 líquido	Con o sin Glicerol.	Criotube, 3cm sobre vapor de N2 líquido 30 min.	Glicerol	La motilidad, viabilidad, tasa de recuperación y fragmentación del ADN fueron similares.
Zhu et al., 2014	N	Vial Criogénico, 0,25 mL, TA 1 min. Inmersión en N2 líquido	Libre de crioprotector permeable (sacarosa)	Vial Criogénico, 0,5 mL. TA 5 min. 3cm sobre vapor de N2 líquido 30 min	Glicerol	Mayor motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática y del acrosoma en la vitrificación; Sin diferencias en la estabilidad del ADN.
	N	Pajuela en pajuela 100 µl. Inmersión en N2 líquido	HTM+ sacarosa 0,25M	Pajuela de 0,5 mL, TA 10 min. 8cm sobre vapor de N2 líquido 15 min.	Medio Comercial	Motilidad, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial similares.



Slabbert et al., 2015	N	300 µl de muestra en pajuela de 1,5 mL, TA 10 min. Inmersión en N2 líquido	Libre de crioprotector permeable (sacarosa + albumina 1%)	Pajuela de 0,5 mL, TA 10 min. Sobre el vapor de N2 líquido 15 min.	Medio de Congelamiento TEST-YOLK	Mayor potencial de membrana mitocondrial y menor porcentaje de fragmentación de ADN en vitrificación. No hay diferencia en la motilidad.
Tongdee et al., 2015	N	Criovial, 0,25 mL, TA 10 min. Inmersión en N2 líquido	Medio Comercial de congelamiento	Criovial, 0,25 mL. 25 °C ~5 °C a 1 °C/min; 5 °C ~ -85 °C a 10 °C/min.	Medio Comercial de congelamiento	La motilidad disminuyó más en la vitrificación. No hay diferencia en la morfología o la integridad del ADN.
Ali Mohamed, 2015	N	37 °C 5 min, gota de 20 µl. Inmersión en N2 líquido	Nuevos kits libres de crioprotectores permeables	Criotubo de 0,8 mL, 4 °C 30 min, Vapor de N2 líquido por 30 min.	Glicerol	Mayor motilidad y morfología normal, y menor fragmentación del ADN en vitrificación.
Karthikeyan et al. 2019	OA	Criológico con stripper, bloque de metal preenfriado, bañado en N2 líquido	0,25M sucrose	Pajuela francesa de 0,5 mL, a -85 °C en un congelador durante 1 h	Medio de congelamiento de espermatozoides	La vitrificación resultó en una mayor motilidad y vitalidad.

Le et al., 2019	exclusivo de criptozoospermia / azoospermia	Gota de 30 $\mu$ l. Inmersión en N2 líquido	Solución de congelamiento de espermatozoides	Criotubo de 1,8 ml, TA 10 min~, sobre el vapor de N2 líquido 15 min.	Solución de congelamiento de espermatozoides	Mayor motilidad en el método de congelación convencional, mientras que la vitrificación resultó en una mayor viabilidad y morfología normal.
Pabon et al., 2019	Normal	Grilla colectora, gota de 5-10 $\mu$ l. Inmersión en N2 líquido	Combinación de sacarosa 0,15M y trealosa.	TA 10 min, gota de 50 $\mu$ l en hielo seco, criotubo.	Medio de crioprotección basado en Glicerol.	Mayor motilidad, viabilidad y actividad mitocondrial por vitrificación
Spis et al., 2019	1 zoide epididimario y 1 testicular	Capilares 20 + 8 fueron enpaquetados en pajuelas. Inmersión en N2 líquido	Sacarosa 0,25M	Capilares 20 + 8. Vapor de N2 líquido 30 min.	Medio de congelamiento TYB (glicerol)	La vitrificación tuvo un mayor potencial de membrana mitocondrial y motilidad tanto en los capilares del epidídimo como en los testículos.

N= Normozoospermia

OA= Oligoastenozoospermia

DN: Donantes normales

I: Criterio poco claro

TA: temperatura ambiente

Un informe de revisión sistemática y metanálisis comparó la efectividad de dos técnicas (22). Se revisaron 2428 publicaciones y 13 ensayos controlados aleatorios, se incluyeron 486 muestras de espermatozoides humanos vitrificados y de congelación convencional. Como resultado, se determinó que la vitrificación era superior a la congelación convencional con respecto a la motilidad total y progresiva en la preservación de espermatozoides (22). Por lo tanto, la vitrificación de espermatozoides humanos demostró un potencial superior en la crioconservación de espermatozoides, pero el procedimiento requiere una mayor optimización.

Este capítulo se centrará en la vitrificación de espermatozoides humanos, describiendo las metodologías de vitrificación actuales en uso, las ventajas sobre otros métodos de crioconservación y la aplicación clínica.

## Efecto de los crioprotectores en la criopreservación de semen

Los crioprotectores actúan deprimiendo el punto de congelación y uniendo el agua intracelular para evitar la formación de hielo y reducir los daños criogénicos (11). Es importante destacar que el crioprotector no debe ser tóxico para las células durante la congelación y descongelación. Hay dos tipos principales de CPA: permeables y no permeables. Los CPA permeables incluyen sulfóxido de dimetilo, glicerol, etilenglicol y metanol; otro son los CPA no permeables, que incluyen albúminas y dextranos y citrato de yema de huevo, y azúcares como la rafinosa y la sacarosa (11).

## Agentes crioprotectores permeables y no permeables

Los CPA permeables reducen las concentraciones de electrolitos presentes en la fase líquida de la muestra y estabilizan la membrana plasmática celular, siendo los popularmente utilizados el dimetil sulfóxido (DMS) y glicerol. Los crioprotectores no permeables reducen la cristalización intracelular, aumentando la viscosidad de la muestra para proteger la membrana plasmática del daño extracelular (23). Aunque el CPA es importante para prevenir la cristalización del hielo y el daño celular, es tóxico en altas concentraciones, y los espermatozoides son vulnerables a los cambios osmóticos.

La efectividad de los CPA permeables para prevenir la formación de hielo intracelular durante la congelación lenta convencional solo podría lograrse con una velocidad de enfriamiento lenta, que podría dañar por sí misma (24). Y los daños mecánicos causados por la congelación lenta resultan de la formación de cristales de hielo intracelulares o extracelulares y el daño osmótico, la contracción celular extensa. El posterior calentamiento y descongelamiento de las células podría deteriorar aún más su viabilidad a través de un posible hinchamiento osmótico excesivo y una menor actividad de defensa antioxidante eroxidación lipídica (24,25). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) conduce a una mayor peroxidación de lípidos después de la congelación, que también se asocia con una pérdida de motilidad de los espermatozoides (26,27). Todos estos efectos negativos de la congelación convencional durante el proceso de equilibrio de hielo en las células también podrían conducir al daño de la cromatina, y las anomalías de la cromatina podrían dañar la calidad del esperma y el estado de fertilidad masculina (28).

Teniendo en cuenta las características de tamaño más pequeño y el escaso citoplasma en los espermatozoides humanos, una de las desventajas de la congelación convencional es la presión osmótica y la toxicidad del crioprotector permeable de alta concentración, lo que llevó a que el CPA se utilizara inicialmente sin éxito (2). Y es importante tener en cuenta al menos tres variables: la tasa de enfriamiento-calentamiento, la concentración y el tipo de crioprotector, y el sistema de soporte adecuado (pajuela u otros). La última variable se refiere al material que transfiere la reducción de temperatura de manera suficiente y rápida al interior que contiene la muestra (29).

Por lo tanto, se desarrolló el método de vitrificación libre de crioprotector permeable. El avance de la vitrificación de espermatozoides humanos sin CPA permeable fue informado por primera vez por Nawroth et al (7). La combinación de tasas extremadamente altas de enfriamiento/calentamiento y la utilización de medios de vitrificación que contenían proteínas y polisacáridos hizo factible evitar la desvitrificación durante el calentamiento sin usar el CPA de alta concentración.

Los crioprotectores no permeables (carbohidratos como la glucosa, la sacarosa y la trehalosa) no podían atravesar las membranas celulares por su alto peso molecular (30,31). En lugar de la citotoxicidad de las altas concentraciones de CPA permeables, los CPA no permeables podrían promover de manera eficaz la deshidratación celular rápida, incluso con alta velocidad de congelación para evitar la formación de hielo y estabilizar proteínas y membranas celulares (2,8). La sacarosa juega un papel importante compensando la presión osmótica y estabilizando la membrana celular durante la vitrificación (32-34). En nuestro grupo investigamos una tecnología de vitrificación libre de CPA para espermatozoides humanos (1,12,35). Al principio, logramos una vitrificación libre de CPA mediante un medio de fluido tubular humano (HTF) suplementado con albúmina sérica humana (HSA) al 1 % y sacarosa 0,25 M como crioprotectores no permeables. Se demostró que la vitrificación sin crioprotectores de espermatozoides humanos con sacarosa 0,25 M podía crioconservar las células de manera eficiente sin una pérdida significativa de parámetros fisiológicos cruciales (1). Estos estudios confirmaron la preservación superior de parámetros fisiológicos, como motilidad, viabilidad, reacción acrosómica y mitocondrial.

En general, la técnica de vitrificación sin crioprotectores evita los impactos negativos adicionales causados por la adición o eliminación de CPA permeables de alta concentración en la congelación convencional.

## La vitrificación de espermatozoides humanos: tecnologías libres de crioprotectores permeables versus tecnologías con crioprotectores incluidos

La eficacia del proceso de vitrificación sin crioprotectores para espermatozoides humanos está bien documentada (1,20,35,36). Estos estudios realizaron la vitrificación sumergiendo directamente pequeños volúmenes de espermatozoides en N<sub>2</sub> líquido, de 1 a 10 µl (36) diluidos en medio de sacarosa 0,25 M, y de 20 a 30 µl (1) por goteo directo en N<sub>2</sub> líquido. En ausencia de CPA permeable, al disminuir el volumen de la muestra crioconservada y aumentar la relación superficie-volumen de la muestra para lograr tasas ultrarrápidas de vitrificación (8,37). Y también desarrollamos la tecnología aséptica de vitrificación de espermatozoides humanos en un gran volumen (100 µl) para la inseminación intrauterina (38) y capilares para la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (12). Después de eso, el nacimiento de niños sanos después de la ICSI y después de la inseminación intrauterina confirma la capacidad de la vitrificación sin crioprotectores para proteger las células del daño criogénico letal (39,40). Sin embargo, la vitrificación de espermatozoides humanos sin crioprotectores no se ha aplicado a la práctica habitual.

A diferencia de la vitrificación tradicional utilizada para embriones y ovocitos en ART, el espermatozoide humano tiene fragilidad osmótica y no puede exponerse a una alta concentración de solución de CPA por mucho tiempo. Normalmente, el medio de vitrificación del semen es isosmótico entre 300 a 396 mOsm/L, y los CPA permeables aumentarían la presión osmótica, fluctuando entre 600 y 1000 mOsm/L (24,25). Así, aplicando una mezcla de CPA no permeables (sacarosa habitual) y una menor concentración de CPA permeables para la vitrificación de espermatozoides también es un hallazgo

importante para mantener la osmolaridad. La solución de vitrificación combinada podría reducir la cantidad de CPA permeables necesarios para proteger las células y disminuir la toxicidad de los CPA permeables; también podría acortar el tiempo de exposición de las células a los efectos tóxicos de los crioprotectores permeables (2).

Pero la combinación exactamente óptima de medios y el efecto positivo en la vitrificación de espermatozoides humanos aún necesita más investigación. Una variedad de medios de congelación comerciales contenían una mezcla de CPA permeables y no permeables producidos para mejorar la tasa de recuperación de espermatozoides después de la crioconservación de diferentes tipos de animales, incluidos los humanos. Recientemente, se ha logrado la vitrificación de espermatozoides humanos por inmersión directa en  $N_2$  líquido en presencia de un crioprotector comercial. Berkovitz et al (41) y Belenky et al (42) informaron el estudio utilizando el medio de congelación de esperma de Quinn para la vitrificación de espermatozoides. Los estudios revelaron que los espermatozoides móviles únicos de pacientes con azoospermia no obstructiva se transfirieron a gotas de 0,8  $\mu$ l de suspensión de espermatozoides que incluían medios de congelación de espermatozoides y se sumergieron en  $N_2$  líquido; después de la descongelación, se encontraron altas tasas de recuperación (96% y 99%, respectivamente), motilidad (33% y 37%, respectivamente), fecundación (59%), embarazos clínicos (55%), tasa de parto (32%). Se demostró que el método descrito permite obtener espermatozoides post-descongelados de alta calidad. Más importante aún, el medio de congelación contiene glicerol como crioprotector; el glicerol es uno de los cuatro crioprotectores permeables más populares para la crioconservación de espermatozoides humanos. Además, la técnica de vitrificación también se ha realizado con éxito en espermatozoides animales en presencia de CPA permeables (43-45).

Sin embargo, Le et al (19) y Agha-Rahimi et al (13) utilizaron la solución Sperm Freeze (Vitrolife) que contenía glicerol para desempeñar el papel de protección del crioprotector permeable durante la congelación, y no encontraron diferencias significativas en los parámetros de los espermatozoides después de la descongelación entre subgrupos de vitrificación (con/sin crioprotector permeable). Por lo tanto, la presencia o ausencia de crioprotectores permeables en la vitrificación de espermatozoides humanos sigue siendo controvertida. Específicamente, probamos la tecnología de vitrificación capilar aséptica utilizando medios permeables con crioprotector incluido y sin crioprotector para comparar la eficacia crioprotectora de CPA para la conservación de espermatozoides humanos, y los resultados han sido publicados (46). En nuestro estudio, se contó con un control (espermatozoides frescos) y tres grupos de tratamiento de la siguiente manera: libre de crioprotector (Grupo 1), medio de cultivo con Suplemento de Suero Dextrano al 5% (DSS), medio de cultivo libre de crioprotectores (Grupo 2), con 5% de DSS y 0,25 M de sacarosa; crioprotector incluido (Grupo 3), medio de cultivo con 5% DSS y 7,5% glicerol.

Después de la descongelación, se determinaron la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática y la motilidad total. Se demostró que la motilidad progresiva de los espermatozoides en los grupos 1, 2, 3 fue de  $24,9 \pm 1,7$  %,  $34,5 \pm 2,8$  % y  $34,0 \pm 1,4$  %, respectivamente ( $P_{1-2,3} < 0,01$ ), y la tasa de motilidad en los tres tratamientos fue menor que en los espermatozoides frescos ( $68,8 \pm 5,8$  %,  $P < 0,01$ ). Las tasas de integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides en los grupos 1, 2, 3 fueron  $33,3 \pm 2,1$  %,  $48,4 \pm 2,9$  % y  $45,5 \pm 3,9$  % ( $P_{1-2,3} < 0,05$ ), con una disminución en el Grupo 3 en comparación con el Grupo 2 ( $P_{2-3} > 0,1$ ), pero inferior a esta tasa de espermatozoides frescos ( $80,6 \pm 3,2$  %,  $P < 0,01$ ). Después de 24 h, 48 h y 72 h de cultivo in vitro, la motilidad total y la viabilidad de los espermatozoides en el Grupo 1 fue significativamente menor que en el Grupo 2 y 3. Las tasas de apoptosis y potencial de membrana mitocondrial en el Grupo 3 y el Grupo 2 fueron todas más altas que en el Grupo 1. Sin embargo, no hubo diferencias significativas para estos parámetros entre el Grupo 3 y 2.

Todos esos resultados respaldan que el glicerol y la sacarosa podrían preservar a los espermatozoides humanos de daños por criopreservación. Y nuestros datos han demostrado que la tasa de motilidad progresiva, motilidad total e integridad de la membrana plasmática después de la vitrificación en el Grupo 2 (con sacarosa) no fue significativamente mayor que en el grupo suplementado con glicerol. Durante el cultivo in vitro de larga duración, hemos observado que los parámetros fisiológicos investigados de los espermatozoides calentados del Grupo 2 (con sacarosa) tienen una tendencia a aumentar en comparación con los espermatozoides del Grupo 3 (con glicerol). Sin embargo, el efecto tóxico del crioprotector se observó durante el cultivo in vitro. Detectamos que el tiempo de supervivencia de los espermatozoides vitrificados con el medio de congelación comercial fue significativamente menor que en el medio de sacarosa, lo que podría deberse al impacto letal del choque osmótico y la toxicidad causada por el crioprotector permeable.

Finalmente, concluimos que la suplementación del medio para la tecnología capilar aséptica para la vitrificación sin crioprotector de espermatozoides humanos con glicerol crioprotector permeable no mejora la calidad de los espermatozoides post-descongelados. Sin embargo, la principal limitación de este estudio fue el uso del medio comercial Sperm freeze (FertiPro) en lugar de glicerol puro. Y los resultados presentados también respaldaron una hipótesis: una concentración adecuada pero tolerable (subtóxica) de glicerol para la vitrificación de espermatozoides humanos podría ser factible de ser usada.

## **Métodos de enfriamiento aséptico**

La mayoría de los métodos de vitrificación propuestos para obtener velocidades de enfriamiento ultrarrápidas se realizan en sistemas abiertos sumergiéndolos en  $N_2$  líquido, como "cryoloop", lo que traería riesgos potenciales de contaminación ya que los sistemas abiertos exponen las muestras directamente a  $N_2$  líquido. Es importante explorar un método de enfriamiento aséptico para crioconservar espermatozoides. Por lo tanto, nuestro grupo llevó a cabo investigaciones sobre la tecnología de vitrificación aséptica, centrándose principalmente en los métodos de microgotas y la vitrificación capilar en pajuelas.

## Vitrificación por microgotas

La eficacia de la vitrificación sin crioprotectores se descubrió al dejar caer directamente pequeñas gotas de una suspensión de espermatozoides humanos en nitrógeno líquido (1). En 2008, nuestro grupo sugirió el método de vitrificación que resolvió el problema de la criopreservación de espermatozoides en pequeños volúmenes. En este método, se colocaron 30 µL de espermática directamente en N<sub>2</sub> líquido y se recogieron en criotubos para su almacenamiento. Sin embargo, uno de los problemas con esta técnica es que la esterilización completa del N<sub>2</sub> líquido producido comercialmente es imposible, y la criopreservación de objetos biológicos no aislados (con exposición directa a N<sub>2</sub> líquido) tendría riesgos potenciales de contaminación por virus, bacterias, hongos y esporas (47-50), lo que afectaría la supervivencia de los ovocitos, embriones y espermatozoides después de la criopreservación (51-53). Además, los contaminantes podrían estar ya viviendo en el nitrógeno líquido comercial o la contaminación cruzada entre muestras (50,51). La infección microbiana amenaza los objetos biológicos trasplantados a los pacientes, como los procedimientos de fertilización in vitro y el trasplante de corteza ovárica (54). Por lo tanto, para evitar los riesgos potenciales de contaminación durante la criopreservación, se desarrolló un dispositivo de sobremesa para la producción de aire líquido estéril.

El dispositivo CLAir fue diseñado para prevenir la posible contaminación microbiana causada por el N<sub>2</sub> líquido producido comercialmente para la criopreservación de células.<sup>55</sup> El dispositivo que utilizamos puede producir aire líquido limpio (CLAir, FertileSafe, Nes Ziona, Israel) con una temperatura similar (-195,7 °C) a N<sub>2</sub> líquido. Y las mediciones de temperatura, mediciones de porcentaje de oxígeno y pruebas de carga biológica se realizaron en el aire líquido, lo que indicó que el aire líquido producido tiene las mismas propiedades que el N<sub>2</sub> líquido y podría adoptarse en el laboratorio de tratamiento asistido para eliminar posibles contaminaciones. Arav et al (54) e Isachenko et al (56) informaron sobre el uso del dispositivo para la vitrificación de seguridad en ovocitos humanos y embriones de ratón. Además, nuestro grupo también logró la vitrificación de los espermatozoides humanos al dejar caer directamente la suspensión de espermatozoides humanos en el aire líquido. De acuerdo con nuestro informe anterior (57), usando una micropipeta a una distancia de 10 cm del agente líquido respectivo, se cayeron alícuotas de 20 µL de suspensión de espermatozoides directamente en este agente refrigerante.

Inmediatamente se formó una esfera y flotó hacia la superficie. Después de 10 seg en aire líquido, la esfera se solidificó y cayó al fondo del colador. Después de la solidificación, las esferas se recogieron, se envasaron en criotubos de 1,8 ml y se almacenaron durante al menos 24 h en un tanque con N<sub>2</sub> líquido antes de calentar. El calentamiento se realizó sumergiendo rápidamente las esferas, una por una (no más de cinco esferas), en un medio de cultivo basal de 5 ml precalentado a 37°C, acompañado de agitación suave durante 10 s. La suspensión de esperma calentada se mantuvo a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 10 min. En nuestro estudio, encontramos que los porcentajes de "motilidad progresiva", "viabilidad" y "apoptosis" de la suspensión de espermatozoides que caían en N<sub>2</sub> líquido y Liquid air eran similares. Estos resultados sugirieron que la vitrificación sin crioprotectores mediante la aplicación directa de espermatozoides humanos en un agente refrigerante limpio (aire líquido) es una buena alternativa al nitrógeno líquido no estéril, lo que minimiza el riesgo de contaminación microbiana.

## Vitrificación capilar en pajuela

El método se llevó a cabo en pajuelas dobles envasadas por un sistema cerrado. Una pajuela llena de suspensión espermática dentro de otra pajuela podría proteger contra la suspensión celular de unirse directamente con el N<sub>2</sub> líquido porque está completamente sellada, lo que la hace completamente aséptica.

Para el sistema cerrado, se aplicaron diferentes tipos de sistemas y dispositivos de envasado: el OPS (36), pipetas ICSI (58), crioloops de nailon y 'CryoTop (31,35,59) y cápsulas de agarosa de núcleo hueco (60), micro-pajuela (61). Sin embargo, no eran herramientas estándar con el diámetro uniforme y el material aceptable presentado en la vitrificación de semen. En 2012, Isachenko et al (12) modificaron este método utilizando capilares comerciales en el sistema de envasado para la vitrificación de espermatozoides. Los capilares estándar fueron suministrados por fabricantes industriales. Porque los proveedores comerciales ofrecen capilares de plástico de forma cilíndrica regular con un diámetro estable (fijo) para aplicaciones médicas, y se obtuvieron volúmenes cuantificables exactos de 10 µl de muestras de espermatozoides, lo que hizo posible estandarizar el proceso de vitrificación utilizando estos capilares estándar. La tecnología de vitrificación aséptica desarrollada de espermatozoides humanos por capilares sin crioprotectores permeables podría proteger eficazmente a los espermatozoides de las criolesiones mejor que la congelación convencional.

En 2021, mejoramos el método aséptico del capilar en pajuela utilizando la microherramienta innovadora de manipulación con una pipeta de 600 µm de diámetro (Vitromed GmbH, Jena, Alemania), que puede ser el capilar alternativo que se informó anteriormente para la vitrificación de espermatozoides. Estos capilares están fabricados con plástico hidrofóbico que evita el efecto capilar cuando se sumergen en una solución. Esa peculiaridad del plástico evita que las muestras aún congeladas dentro del capilar floten por encima del nivel del medio de calentamiento. Como informamos anteriormente (46), el procedimiento de vitrificación capilar aséptica se realizó como se ilustra en la **Figura**. Antes de la manipulación, se etiquetó en la parte superior un extremo de todos los capilares para marcar la posición de "corte" (**Figura**, flechas continuas). En resumen, se aspiraron 10 µL de suspensión de espermatozoides con una micropipeta (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se colocaron en una placa de petri Falcon de 35 × 10 mm (Life Sciences, Durham, EE. UU.). A

continuación, los capilares se llenaron uno por uno con 10  $\mu\text{L}$  de suspensión de espermatozoides mediante un controlador de pipeta IVF (Medical Technology GmbH, Bruckberg, Alemania), y se marcó la posición (Figura, flechas vacías).

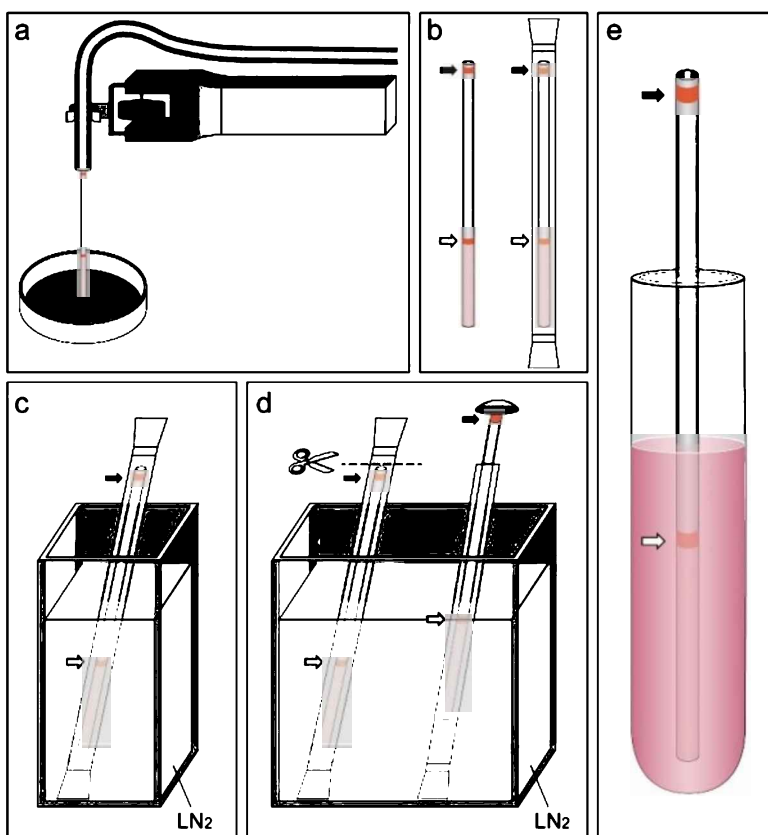


Figura 1. LN2:  $\text{N}_2$  líquido.

A continuación, el capilar lleno se insertó en una pajuela de 0,25 ml (Medical Technology GmbH, Bruckberg, Alemania). Un extremo se selló previamente con un sellador térmico (Cryo Bio System, París, Francia) y, después de sellar el otro extremo de la pajuela, el sistema capilar en pajuela empacado se sumergió directamente en nitrógeno líquido (Figura, c). Se almacenó en  $\text{N}_2$  líquido durante al menos 24 h antes de calentar. Para el calentamiento, se cortó la parte superior de la pajilla justo por encima de la posición de la marca, sin tocar el extremo del capilar (Figura d); se transfirió un capilar y se sumergió en 2 ml de medio HTF-HSA precalentado a  $42^\circ\text{C}$  durante 15 s (Figura e). La suspensión de espermatozoides fue expulsada inmediatamente del capilar para la siguiente evaluación.

El estudio utilizó la pipeta suministrada comercialmente de forma regular con diámetro estable (fijo) para almacenar muestras. Los procedimientos de vitrificación se pueden estandarizar utilizando estas microherramientas estándar, y nuestros datos confirmaron la seguridad y eficacia del capilar con un diámetro de  $600\ \mu\text{m}$  para la vitrificación de espermatozoides, que revela un excelente potencial utilizando la técnica de vitrificación aséptica para la criopreservación de espermatozoides en ART.

### Aplicabilidad de la vitrificación de semen

Las aplicaciones de la criopreservación de espermatozoides son múltiples. En animales, podría ser un método de almacenamiento de gametas de animales con alta genética y el almacenamiento de gametas de especies en peligro de extinción, por poner algunos ejemplos. En humanos, estos tienen un papel importante en la preservación de la fertilidad de los pacientes con cáncer antes de los tratamientos de quimioterapia o radiación. Además, la criopreservación de espermatozoides también está disponible para pacientes sometidos a vasectomía y para muestras de semen de donantes. En cuanto a los tratamientos de TRA, la criopreservación de semen es una herramienta aún más importante para el caso de la esterilidad masculina, como la oligozoospermia, la astenozoospermia, la azoospermia obstructiva, la azoospermia no obstructiva y la presencia de patologías como el varicocele.

Por primera vez establecimos con éxito la vitrificación de espermatozoides humanos sin crioprotectores permeables (1,7,8,31). Desarrollamos tecnología aséptica de vitrificación de espermatozoides humanos en gran volumen para inseminación intrauterina (38) y en capilares para inyección intracitoplasmática de espermatozoides o fecundación *in vitro* (12). Reportamos el nacimiento de dos bebés luego de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides usando semen vitrificado (39) y un bebé que nació después de una inseminación intrauterina con semen vitrificado de un hombre oligoastenozoospermico (40).

El estudio también informó que el primer nacimiento de un bebé sano después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides utilizando un nuevo protocolo permeable de vitrificación sin crioprotectores de espermatozoides recuperados de un procedimiento TESE. Nuestro estudio demostró que la calidad de los espermatozoides de MESA y TESE vitrificados libres de crioprotectores fue mayor que la de los espermatozoides congelados lentamente con CPA permeables. Este estudio reportó dos casos de bebés nacidos después de ICSI usando vitrificación de espermatozoides móviles MESA y TESE sin crioprotectores (21).

## Conclusión

La aplicación clínica de la vitrificación fue uno de los logros más importantes del TRA humano en la última década. Sin embargo, a pesar de muchos años de estudio, no existen protocolos estándar óptimos para manejar muestras de esperma de humanos o animales. Por ejemplo, las muestras entre diferentes especies, los parámetros anormales del semen o incluso los espermatozoides extraídos del epidídimo y las biopsias testiculares pueden requerir condiciones únicas de criopreservación para obtener resultados óptimos. No se han estandarizado variables como las formas de exposición al nitrógeno líquido y la composición de los medios de vitrificación.

Actualmente, la congelación lenta convencional sigue siendo el método principal utilizado para la criopreservación de esperma, pero la vitrificación de esperma ha demostrado ventajas significativas. A través de los continuos esfuerzos realizados por la técnica de vitrificación de semen, nuestro grupo ha demostrado la eficacia de la vitrificación sin crioprotectores para la conservación de espermatozoides humanos. Además, se confirmó la eficacia de los métodos de enfriamiento aséptico por dispositivo CLAir y capilar. La vitrificación mediante la aplicación directa de una suspensión de espermatozoides humanos en aire líquido limpio producido por CLAir es una buena alternativa al nitrógeno líquido comercial, ya que minimiza la posible contaminación. Y la suplementación del medio para la tecnología capilar aséptica para la vitrificación de espermatozoides humanos sin crioprotectores con crioprotectores permeables no mejora la calidad de los espermatozoides.

Por lo tanto, nuestro laboratorio ha logrado la vitrificación de espermatozoides humanos sin crioprotectores, pero la evidencia a nivel subcelular fue limitada. Además, cada método de crioconservación tiene sus ventajas y limitaciones. Se requieren estudios en profundidad para detectar la función molecular de los crioprotectores y métodos sobre la vitrificación de espermatozoides.

## Referencias

1. Isachenko E, Isachenko V, Weiss J M, Kreienberg R, Katkov, II, Schulz M, Lulat A G, Risopatrón M J, Sánchez R (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 136(2):167-173.
2. Isachenko E, Isachenko V, Katkov I I, Dessole S, Nawroth F (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online* 6(2):191-200.
3. Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H (2012). Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online* 24(3):301-307.
4. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández M A, Gómez-Torres M J (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Hum Reprod* 32(10):2007-2015.
5. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E (2017). Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology* 5(6):1055-1063.
6. Xin M, Siddique M A M, Dzyuba B, Cuevas-Urbe R, Shaliutina-Kolešová A, Linhart O (2017). Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *Theriogenology* 98(Supplement C):16-22.
7. Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, Orth I, Isachenko E (2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters* 23(2):93-102.
8. Isachenko E, Isachenko V, Katkov, II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod* 19(4):932-939.
9. Chang H, Lee J, Chae S, Jee B, Suh C, Kim S (2008). Comparative study of two cryopreservation methods of human spermatozoa: vitrification versus slow freezing. *Fertility and Sterility* 90:S280.
10. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S (2010). Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril* 93(6):1921-1928.
11. Moskovtsev S, Lulat A, Librach C (2012). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification vs. slow freezing: Canadian experience. *Current Frontiers in Cryobiology*:77-100.
12. Isachenko V, Maettner R, Petrunina A, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatrón J, Damjanoski I, Isachenko E (2012). Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *J Androl* 33(3):462-468.
13. Agha-Rahimi A, Khalili M A, Nabi A, Ashourzadeh S (2014). Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reprod Biomed Online* 28(3):352-358.
14. Zhu J, Jin R T, Wu L M, Johansson L, Guo T H, Liu Y S, Tong X H (2014). Cryoprotectant-free ultra-rapid freezing of human spermatozoa in cryogenic vials. *Andrologia* 46(6):642-649.

15. Ali Mohamed M S (2015). Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Iran J Reprod Med* 13(10):633-644.
16. Slabbert M, Du Plessis S, Huyser C (2015). Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia* 47(5):594-599.
17. Tongdee P, Sukprasert M, Satirapod C, Wongkularb A, Choktanasiri W (2015). Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *J Med Assoc Thai* 98 Suppl 4:S33-42.
18. Karthikeyan M, Arakkal D, Mangalaraj A M, Kamath M S (2019). Comparison of Conventional Slow Freeze versus Permeable Cryoprotectant-Free Vitrification of Abnormal Semen Sample: A Randomized Controlled Trial. *J Hum Reprod Sci* 12(2):150-155.
19. Le M T, Nguyen T T T, Nguyen T T, Nguyen V T, Nguyen T T A, Nguyen V Q H, Cao N T (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 234:14-20.
20. Pabón D, Meseguer M, Sevillano G, Cobo A, Romero J L, Remohí J, de los Santos M J (2019). A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. *Andrology* 7(3):293-301.
21. Spis E, Bushkovskaia A, Isachenko E, Todorov P, Sanchez R, Skopets V, Isachenko V (2019). Conventional freezing vs. cryoprotectant-free vitrification of epididymal (MESA) and testicular (TESE) spermatozoa: Three live births. *Cryobiology* 90:100-102.
22. Li Y-x, Zhou L, Lv M-q, Ge P, Liu Y-c, Zhou D-x (2019). Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 233:84-92.
23. Jang T H, Park S C, Yang J H, Kim J Y, Seok J H, Park U S, Choi C W, Lee S R, Han J (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research* 6(1):12-18.
24. Gao D, Mazur P, Critser J K (1997). - Fundamental Cryobiology of Mammalian Spermatozoa. In: Karow A.M., Critser J.K., editors. *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press: San Diego, p. 263-328.
25. Gao D Y, Liu J, Liu C, McGann L E, Watson P F, Kleinhans F W, Mazur P, Critser E S, Critser J K (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10(5):1109-1122.
26. Aitken R J (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 84(10):1039-1052.
27. O'Connell M, McClure N, Lewis S E (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17(3):704-709.
28. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J (1996). Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod Update* 2(6):553-559.
29. Zachariassen K E, Kristiansen E (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41(4):257-279.
30. Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L (2014). Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv Exp Med Biol* 791:137-150.
31. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I I, Montag M, Dessole S, Nawroth F, van der Ven H (2004). Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of Reproduction* 71(4):1167-1173.
32. Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S (1991). [Cryopreservation of mouse spermatozoa]. *Jikken Dobutsu* 40(4):493-497.
33. Koshimoto C, Mazur P (2002). The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiology* 45(1):80-90.
34. Koshimoto C, Gamliel E, Mazur P (2000). Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology* 41(3):204-231.
35. Chen Y, Li L, Qian Y, Xu C, Zhu Y, Huang H, Jin F, Ye Y (2015). Small-volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop. *Andrologia* 47(6):694-699.
36. Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zueva V, Krivokharchenko I, Nawroth F, Dessole S, Katkov I I, Der Ven H V (2005). Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 10(3):350-354.
37. Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A (2008). Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 10(5):268-273.
38. Isachenko V, Maettner R, Petrunkina A M, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I, Isachenko E (2011). Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume: a novel technology. *Clin Lab* 57(9-10):643-650.
39. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina A M, Sanchez R (2012). Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. *Reprod Fertil Dev* 24(2):323-326.
40. Sanchez R, Isachenko V, Petrunkina A M, Risopatron J, Schulz M, Isachenko E (2012). Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. *J Androl* 33(4):559-562.



41. Berkovitz A, Miller N, Silberman M, Belenky M, Itsykson P (2018). A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Human Reproduction* 33(11):1975-1983.
42. Belenky M, Itzhakov D, Freger V, Roseman O, Abehsera S, Miller N, Berkovitz A (2020). Optimizing the protocol for vitrification of individual spermatozoa by adjusting equilibration time. *Systems Biology in Reproductive Medicine*:1-6.
43. McClean R, Zee Y P, Holt W V, Johnston S D (2008). Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 57(3):304-307.
44. Nouri Gharajelar S, Sadrkhanloo R A, Onsoni M, Saberivand A (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary research forum : an international quarterly journal* 7(3):235-239.
45. Zilli L, Bianchi A, Sabbagh M, Pecoraro L, Schiavone R, Vilella S (2018). Development of sea bream (*Sparus aurata*) semen vitrification protocols. *Theriogenology* 110:103-109.
46. Wang M, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Wang W, von Brandenstein M, Kumar P, Mallmann P, Isachenko V (2021). Aseptic capillary vitrification of human spermatozoa: Cryoprotectant-free vs. cryoprotectant-included technologies. *Cryobiology* 99:95-102.
47. Bielanski A (2005). Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology* 63(7):1946-1957.
48. Bielanski A (2005). Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers ☆. *Cryobiology* 50(2):206-210.
49. Bielanski A (2012). A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* 77(3):467-482.
50. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi F M (2015). Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 30(4):325-333.
51. Grout B W, Morris G J (2009). Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology* 71(7):1079-1082.
52. Arav A, Natan Y (2013). Vitrification of oocytes: from basic science to clinical application. *Adv Exp Med Biol* 761:69-83.
53. Bielanski A, Bergeron H, Lau P C, Devenish J (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 46(2):146-152.
54. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet V, Pellicer A (2014). Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertility and Sterility* 101(3):775-784.
55. Arav A, Natan Y, Levi-Setti P E, Menduni F, Patrizio P (2016). New methods for cooling and storing oocytes and embryos in a clean environment of -196°C. *Reproductive BioMedicine Online* 33(1):71-78.
56. Isachenko V, Todorov P, Seisenbayeva A, Toishibekov Y, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Foth D, Merzenich M (2018). Vitrification of human pronuclear oocytes by direct plunging into cooling agent: Non sterile liquid nitrogen vs. sterile liquid air. *Cryobiology* 80:84-88.
57. Wang M, Isachenko E, Todorov P, Rahimi G, Mallmann P, Katkov, II, Isachenko V (2020). Aseptic Technology for Cryoprotectant-Free Vitrification of Human Spermatozoa by Direct Dropping into Clean Liquid Air: Apoptosis, Necrosis, Motility, and Viability. *Biomed Res Int* 2020:2934315.
58. Sohn J, Jun S, Park L, Kim E, Chung T, Lee D (2003). Comparison of recovery and viability of sperm in ICSI pipette after ultra rapid freezing or slow freezing. *Fertility and Sterility* 80:128.
59. Desai N N, Blackmon H, Goldfarb J (2004). Single sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. *9(1):47-53.*
60. Araki Y, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Araki Y (2015). Single human sperm cryopreservation method using hollow-core agarose capsules. *Fertility and Sterility* 104(4):1004-1009.
61. Liu F, Zou S-S, Zhu Y, Sun C, Liu Y-F, Wang S-S, Shi W-B, Zhu J-J, Huang Y-H, Li Z (2017). A novel micro-straw for cryopreservation of small number of human spermatozoon. *Asian journal of andrology* 19(3):326-329.
62. Medrano L, Enciso M, Gomez-Torres M J, Aizpurua J (2019). First birth of a healthy infant following intra-cytoplasmic sperm injection using a new permeable cryoprotectant-free sperm vitrification protocol. *Cryobiology* 87:117-119.

# CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES

Rocío Núñez Calonge<sup>1</sup>

Pedro Caballero Peregrín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Directora Científica de Grupo UR Internacional; Madrid, España. <sup>2</sup>Patrono Fundación IERA, Madrid, España.

Autora correspondiente: Dra. Rocío Núñez Calonge. Correo electrónico: [rocioncalonge@gmail.com](mailto:rocioncalonge@gmail.com)

## Cápsula

En este capítulo se revisan las principales técnicas de congelación y descongelación de espermatozoides testiculares, sobre todo en el caso de las azoospermias no obstructivas.

## Introducción

La prevalencia de la azoospermia es alrededor de un 1% en la población masculina (1), y entre un 10-15% en parejas que acuden a un tratamiento de fertilidad (2).

La recuperación espermática testicular, bien por aspiración (TESA), o por extracción testicular (TESE), combinada con microinyección intracitoplasmática (ICSI), es un tratamiento efectivo para varones con azoospermia, que pueden así, conseguir ser padres biológicos. Desde los primeros trabajos en los que se publicó el uso de espermatozoides testiculares con ICSI (3,4), este método se utiliza de forma rutinaria en los varones tanto con azoospermia obstructiva (AO) como azoospermia no obstructiva (ANO).

El tejido obtenido tras la TESE se examina histológicamente para comprobar la causa de la azoospermia, y los espermatozoides recuperados pueden emplearse inmediatamente para ICSI o bien pueden ser criopreservados para el futuro.

La micro disección espermática testicular (micro-TESE) es la alternativa a las biopsias abiertas aleatorizadas y más comunes. Consiste en una biopsia testicular realizada con amplificación visual microscópica (microscopio quirúrgico) que permite identificar las zonas del testículo donde seguramente se encontrarán espermatozoides. Permite minimizar el daño testicular frente a una biopsia abierta, y ser más selectivo en la toma de muestras. Con las biopsias convencionales se extrae mucho tejido testicular, pudiendo llegar a incidir en una de las funciones de los testículos, como es la producción de testosterona.

La micro-TESE fue descrita por primera vez en 1999 (5), y es considerada como el “gold standard” para la obtención de espermatozoides en varones con azoospermia no obstructiva (6). Este tipo de azoospermia, cuya causa es la disfunción en la espermatogénesis, representa un desafío a la hora de obtener espermatozoides. La recuperación espermática oscila entre un 16,7 a un 63% (7). Las causas de azoospermia no obstructiva, desde un punto de vista histológico, pueden clasificarse en: hipoespermatogénesis, la cual conlleva el mayor porcentaje de recuperación espermática: entre un 73 y un 100%; parada madurativa, con una recuperación entre el 27 y el 86% y síndrome de solo Sertoli, que es la forma más severa, con una recuperación entre un 22,5 y un 41% (8).

Si tras la recuperación espermática y posterior ICSI no se consigue el embarazo, la repetición de una micro TESE no garantiza al 100% la recuperación espermática (9). De esta forma, la criopreservación es necesaria para evitar repetidas biopsias para cada ciclo de ICSI.

Desde que en 1996 Liu publicara el primer nacimiento con la utilización de espermatozoides de testículo congelados (10), la criopreservación de espermatozoides tras TESE y posterior ICSI se ha convertido en un método utilizado de rutina para evitar repetidas e innecesarias biopsias de testículo en varones azoospermicos. Sin la criopreservación, los espermatozoides testiculares solo pueden utilizarse en un ciclo de ICSI. Cirugías testiculares repetidas pueden causar un daño testicular permanente, atrofia irreversible, deterioro del desarrollo espermatogénico e incluso pérdida de la función endocrina (11).

La recuperación quirúrgica de espermatozoides en el varón crea una enorme presión tanto en los pacientes como en los andrólogos, de forma que el conservar muestras criopreservadas reduce el estrés.

Un año después del trabajo de Liu, se publicó la primera comparación de resultados empleando espermatozoides de testículo en fresco y congelados en pacientes con ANO, no observándose diferencias significativas en la tasa de fecundación, gestación y nacido vivo (12). Desde entonces, el número de trabajos ha aumentado enormemente, con diferentes resultados y los datos publicados que comparan resultados de ICSI con espermatozoides de testículo frescos frente a congelados, son motivo de controversia (13-15). Una posibilidad que pudiera resolver tales discrepancias es que los métodos de congelación varían entre estos grupos, y que la técnica de congelación y descongelación puede afectar significativamente a los resultados de ICSI.

El propósito de este capítulo es revisar las principales técnicas de congelación y descongelación de espermatozoides testiculares, sobre todo en el caso de las azoospermias no obstructivas, y realizar una revisión de los resultados clínicos en la literatura.

## **Aspectos biológicos de la criopreservación**

Para garantizar el éxito de la criopreservación espermática es necesario conocer los fundamentos de la criobiología celular.

Una de las causas principales del daño celular durante la congelación y descongelación es la formación de cristales de hielo. Para poder reducir la cantidad de cristales de hielo que se forman durante el proceso se utilizan varias estrategias como son el uso de crioprotectores que aumenten la cantidad total de concentración de solutos, el incremento del grado de deshidratación celular y cambiar la velocidad de congelación o descongelación. El tratamiento de las células con crioprotectores fuerza el movimiento del agua por osmosis y conduce a la deshidratación de la célula. Mientras que la salida del agua fuera de la célula puede ayudar a disminuir la formación de cristales de hielo, esto puede ocasionar nuevos problemas como es el choque osmótico (16) y un cambio perjudicial en el volumen (17).

En 1963, Mazur (18), demostró que el grado de enfriamiento afecta sustancialmente la probabilidad de cristalización intracelular, dirigida por el grado en que el agua se transporta a través de la membrana. De esta forma, la velocidad de enfriamiento controla la velocidad a la que el agua se convierte en hielo y, como resultado, influye en la velocidad a la que aumenta la concentración de los solutos extracelulares y, por lo tanto, en la velocidad a la que el agua sale de la célula. Si las células grandes con una permeabilidad relativamente baja se enfrían lentamente, es posible aumentar la probabilidad de que estas células sufran deshidratación, lo que evitará la formación temprana de cristales de hielo intracelulares.

Convencionalmente, la concentración de agentes crioprotectores, así como los aditivos estabilizadores de membrana, se correlacionan con la velocidad y sensibilidad de los espermatozoides a temperaturas bajo cero. La composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides es un factor importante que puede influir en la criotolerancia y la sensibilidad al frío de los espermatozoides (19).

El rango crítico de temperatura para la supervivencia de los espermatozoides durante la congelación se encuentra entre los  $-10^{\circ}\text{C}$  y los  $-40^{\circ}\text{C}$ , por lo tanto, cuanto antes pasen este intervalo, mayor será la recuperación post-descongelación (20).

Cuando el semen es enfriado rápidamente a temperaturas próximas a 0°C, un gran porcentaje de células espermáticas aparecen inmóviles, se incrementa el número de espermatozoides muertos y de formas anormales, alterándose la distribución de los lípidos de membrana y aumentando el calcio intracelular, en un fenómeno conocido como "choque frío" (21).

La reducción gradual de la temperatura disminuye el nivel del metabolismo celular prolongando así la vida útil de los gametos masculinos. Los espermatozoides de mamíferos son especialmente sensibles al enfriamiento rápido. El "choque frío", depende de la velocidad de enfriamiento, del rango absoluto de temperatura a la que se desciende, y de la temperatura final que se alcance. Para evitar los efectos adversos del choque frío se emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas (-0, 1°/min a -0, 5°/min), las cuales bajan la temperatura del semen de 30°C a 5°C en períodos de tiempo de una a dos horas (22).

El calentamiento es una "inversión" del proceso de enfriamiento, cuyos objetivos básicos son: rehidratar la célula y retirar el crioprotector que ha permeado la célula. Para evitar el choque osmótico, es importante la eliminación del crioprotector de forma gradual (23).

La velocidad óptima de descongelación depende en gran medida de la técnica aplicada para la congelación. Cuando se utilizan velocidades de congelación altas los mejores resultados post-descongelación han sido obtenidos con descongelaciones también rápidas (24). Por el contrario, si la congelación se realiza con velocidades lentas y la descongelación es rápida, no se concede a la célula el tiempo suficiente para que se restablezca el equilibrio osmótico con el medio externo, originándose la entrada del agua al interior del espermatozoide, provocando la ruptura de estructuras celulares.

### **Métodos de criopreservación de espermatozoides testiculares**

La primera vez que se congeló semen humano fue en 1776 por Spallanzani (25). Desde entonces, se ha avanzado mucho en la mejora de la metodología para la criopreservación espermática, sobre todo desde que se descubriera el uso del glicerol como crioprotector por Polge (26), en 1949. Sin embargo, la aparente facilidad de la congelación de espermatozoides humanos retrasó los estudios criobiológicos específicos durante mucho tiempo, siendo limitadas las investigaciones a un enfoque empírico.

#### *Preparación de las muestras testiculares en fresco*

El procedimiento de biopsia testicular más utilizado es el descrito previamente por Devroey y col (27) y Liu y col (28). El tejido testicular obtenido en la biopsia se coloca en placas Petri con medio de cultivo HEPES tamponado y allí se dilacera el tejido utilizando dos bisturís, dos agujas o en su defecto dos portaobjetos, hasta que se consigue romper en lo máximo posible los túbulos y extraer todo el contenido al medio. Una vez completada la dilaceración, se comprueba al microscopio invertido (200 x ó 400 x) la presencia de espermatozoides. Tanto si se observan a simple vista como si no, el medio de cultivo se transfiere a un tubo Falcon de 15 ml y la muestra se centrifuga durante 5 minutos a 300 g. Después de la centrifugación, se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en medio de cultivo.

Es conveniente no tirar el sobrenadante, sino volver a centrifugarlo otra vez por si se encontraran algunos espermatozoides aislados en el medio. Tras cada centrifugación el medio de cultivo que se añade depende del estado inicial de la muestra: si es muy hemática, hay pocos o muchos espermatozoides, restos celulares, etc. Cuanta más suciedad tenga la muestra, más conviene diluirla para poder luego aislar los espermatozoides. El volumen de medio que se añade oscilará entre 0,3 y 2 ml. Una vez añadido el medio de cultivo se evalúa, con una pequeña gota de la muestra, la movilidad y la morfología de los espermatozoides, y después se dejan los tubos en el incubador a 37°C y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> durante 15-30 minutos, hasta su criopreservación.

#### *Crioprotectores empleados*

Las mismas bases criobiológicas que se siguen para la congelación de espermatozoides de eyaculado, deben respetarse cuando se trata de espermatozoides de testículo. Por esto, las lesiones debidas a la criopreservación sobre las estructuras celulares pueden atenuarse mediante la inclusión de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Estas sustancias

protegen durante los procesos de congelación y descongelación en función de su permeabilidad para las membranas plasmáticas.

Los crioprotectores más empleados en eyaculados son el glicerol y la yema de huevo de gallina, la cual debe su efecto protector a las lipoproteínas de baja densidad. Estas sustancias recubren la célula espermática a modo de camisa reversible durante la congelación y descongelación por una unión lábil que se realiza entre los lípidos de la yema y las lipoproteínas de la membrana plasmática, bloqueando así la entrada de iones calcio a la célula. El glicerol, a pesar de ser comúnmente empleado en la congelación de semen, presenta cierto grado de toxicidad para la propia célula espermática y por ello, la concentración de glicerol utilizada se tiende a reducir (29).

Para la congelación de semen, y en concreto la criopreservación de espermatozoides de testículo, los mejores resultados se obtienen con compuestos asociados al glicerol, empleándose un sistema tampón formado por TES (N-tris (hidroximetil) metil 2 amino etano ácido sulfónico) y TRIS (hidroximetil aminometano), llamado TEST, que contiene además citrato y/o yema de huevo, con porcentajes variables de glicerol (30,31).

Sin embargo, el uso de yema de huevo como agente protector de la membrana se ha sustituido por seroalbúmina en formulaciones comerciales, debido a los potenciales problemas de contaminación que pueden existir y, por lo tanto, es necesaria la eliminación de productos animales del procedimiento de criopreservación para cumplir con las regulaciones internacionales. Algunos autores, además, propugnan que el uso de yema de huevo aumenta el movimiento browniano de los espermatozoides, haciendo más difícil su aislamiento para ICSI (32).

La congelación de espermatozoides de testículo se realiza tras la dilución 1:1 si el criodiluyente es un tampón TEST, y dependiendo de las instrucciones si se trata de un diluyente comercial.

### *Métodos de congelación*

La criopreservación de espermatozoides de testículo puede realizarse de distintas formas, que van desde la inmersión directa de las muestras en nitrógeno líquido (desde temperatura ambiente a  $-186^{\circ}\text{C}$  durante 10 segundos), a congeladores programables donde la temperatura se reduce gradualmente ( $1-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Sin embargo, la congelación de espermatozoides necesita métodos optimizados y específicos para ellos, ya que estructuralmente son diferentes a los espermatozoides de eyaculado. Por ello, los métodos que mejor resultados obtienen son los que emplean una congelación lenta, ya que permiten que el agua salga de la célula y minimizan la formación de cristales de hielo (33). No obstante, también se ha comprobado que una congelación rápida seguida por una descongelación también rápida puede hacer que disminuya el daño. Esto ha sido explicado por Watson (20), ya que las células enfriadas rápidamente (con la mayor probabilidad de hielo intracelular) puede ser rescatado por recalentamiento rápido, que limita el tiempo para que ocurra la recrystalización.

El método más ampliamente empleado es el que utiliza una rampa de descenso de temperatura de  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $25^{\circ}\text{C}$  a  $+5^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}/\text{m}$  desde  $+5$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  y finalmente a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido (34-36).

Durante más de 20 años el método de congelación de eyaculados utilizado por nuestro grupo ha sido el modificado de Nagase y Niva (37,38) utilizando hielo seco y como geometría las píldoras. Aunque el resto de los métodos de criopreservación son igualmente válidos (congeladores automáticos, vapores de nitrógeno líquido, etc), en cuanto a los resultados de recuperación en espermatozoides de eyaculado, el empleo del método de píldoras para los espermatozoides de testículo nos ha reportado algunos beneficios frente al resto. El primero de ellos es que nos permite descongelar tantas píldoras como necesitemos en un ciclo de Microinyección espermática para comprobar evolución de la movilidad, y poder utilizar el resto de la muestra en otros ciclos. Además, los resultados de descongelación de estas muestras nos permiten recuperar el máximo de espermatozoides móviles posible (39,40).

Este método de congelación se realiza de la siguiente forma:

- a. Se diluyen las muestras de semen (una vez centrifugado el material de la biopsia testicular y resuspendido con el medio de cultivo) con el crioprotector TEST a concentración 1:1.

- b. Los tubos con la muestra y el diluyente se introducen en un matraz con agua a temperatura ambiente al nivel del volumen del tubo. Los matraces se mantienen en nevera (4°C) durante 45 minutos.
- c. Mientras tanto, se prepara el bloque de nieve carbónica: en el bloque se practican orificios dejando durante unos segundos por presión, una serie de tornillos clavados en una madera (**Figuras 1, 2, 3 y 4**)
- d. Transcurridos los 45 minutos sacamos los tubos de la nevera, y con una pipeta Pasteur se van situando gotas en cada uno de los orificios practicados en la nieve carbónica (cada gota tiene que ser de 100 µl) (**Figura 5**).
- e. En 2-3 minutos, las gotas cambiarán de color, y cuando se hayan congelado se transfieren a los criotubos, que previamente se habrán mantenido en nitrógeno líquido (**Figura 6**)
- f. Los criotubos se llevan al nitrógeno líquido para su conservación a -196°C (**Figura 7**).



**Figura 1.** Bombona de CO<sub>2</sub> con sonda y adaptador para preparar el hielo seco.



**Figura 2.** Hielo seco resultado de la bombona de CO<sub>2</sub> con sonda.



**Figura 3.** Preparación de los orificios en el hielo seco para depositar la muestra de semen.



**Figura 4.** Orificios en el hielo seco.

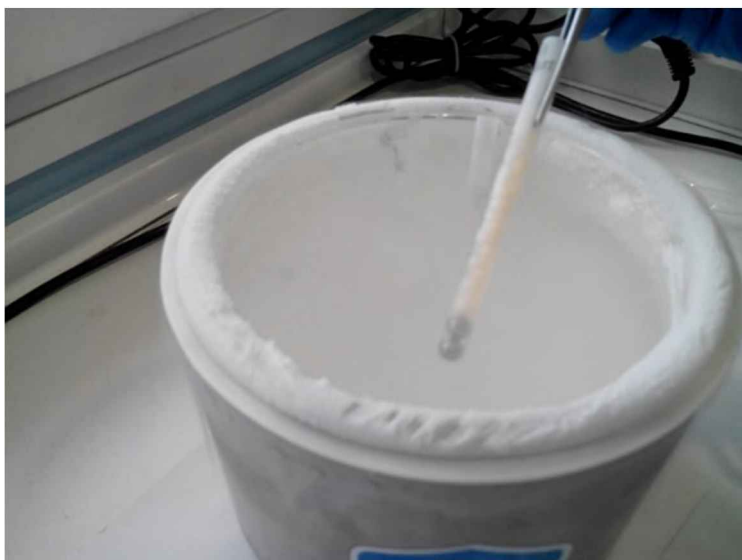


**Figura 5.** El tubo con la muestra de semen y el diluyente se saca del refrigerador, donde se encontraba a 4°C. Con una pipeta calibrada se depositan gotas de 100 microlitros de la mezcla en los orificios del hielo seco.





**Figura 6.** Píldoras formadas con la mezcla de diluyente y semen tras unos segundos en el hielo seco. Una vez han cambiado de color se comprueba que ya están congeladas.



**Figura 7.** Cuando las píldoras han cambiado de color se trasladan a los criotubos (10 píldoras por tubo), que previamente están sumergidos en nitrógeno líquido.

### *Descongelación de espermatozoides de testículo*

La descongelación de células criopreservadas debe sufrir un proceso idéntico pero opuesto al de la congelación. Como ya se mencionó anteriormente, la velocidad de congelación es importante para controlar la formación de cristales de hielo y el grado de deshidratación de la célula. Por lo tanto, el grado de descongelación es importante para la supervivencia espermática. Si las células criopreservadas se descongelan demasiado rápidamente, puede suceder que exista

un flujo de agua al provocarse un desequilibrio osmótico. Por otra parte, una descongelación demasiado lenta originará una recristalización de microcristales de agua intracelular dañando las estructuras celulares (41).

La descongelación de las píldoras (tantas como espermatozoides necesitemos en cada procedimiento), se realiza depositando las mismas en un tubo de cristal graduado y dejando en el baño maría a 37° C durante 5 minutos.

### **Efectos de la criopreservación en los espermatozoides de testículo**

Se ha demostrado que los espermatozoides de varones fértiles son menos susceptibles al daño por criopreservación que en varones infértiles (42). Además, la adición del plasma seminal durante la congelación protege a los espermatozoides de alteraciones del ADN (43). Los espermatozoides testiculares, por su inmadurez y esta ausencia de protección, podrían por ello ser más vulnerables (44,45).

A pesar de los avances en las técnicas de crioconservación y la mejora de los resultados, está claro que la criopreservación aún puede causar daños extensos a las membranas, lo que resulta, por ejemplo, en una disminución del metabolismo de las células y puede alterar los procesos bioenergéticos de las células al dañar las mitocondrias. Además, se ha prestado poca atención a la integridad funcional del material genético en las células reproductivas después de la criopreservación (46).

La crioinjuria solo puede evaluarse comparando los parámetros iniciales y post descongelación, tales como viabilidad (movilidad y vitalidad) y daños estructurales (alteraciones del ADN y morfología). Sin embargo, la capacidad de los espermatozoides para mantener la motilidad después de la criopreservación puede ser de poco valor en condiciones en las que el ADN, nucleoproteínas (principalmente histonas y protaminas) y ADN mitocondrial (ADNmt) es afectado negativamente. Está bien establecido que la criopreservación causa una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (47,48), un factor bien reconocido que daña el ADNmt (49). Por otra parte, el estrés hiperosmótico podría causar roturas de doble cadena de ADN a través de la formación de radicales libres (50) <sup>50</sup>. Esta noción está respaldada por el hecho de que varias enzimas de eliminación de radicales libres, incluida la catalasa, el superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, se activan durante el estrés hiperosmótico en células de mamíferos (51).

Otras publicaciones, sin embargo, sostienen que la congelación de espermatozoides no altera la estructura del ADN (52-55). La discrepancia en los resultados podría explicarse por la diferencia en crioresistencia individual, métodos de crioconservación o métodos de evaluación de ADN empleados. No obstante, los trabajos anteriormente mencionados se han realizado con espermatozoides de eyaculado, de forma que no se pueden extrapolar los resultados a los espermatozoides de testículo. Únicamente Steele y col (56), comparando dos métodos de congelación de espermatozoides demostraron que no existe afectación de la integridad del ADN frente a los espermatozoides testiculares antes de la congelación.

Nogueira y cols, en 1999 (57) realizaron un interesante estudio en el que comparaban el aspecto morfológico de los espermatozoides y espermátides testiculares antes y después de la congelación. Para ello, utilizaron tanto microscopía óptica como electrónica. Sus resultados demostraron que la congelación y descongelación de espermatozoides testiculares cambia las estructuras de las células germinales y de los espermatozoides. El análisis ultraestructural reveló que no se observaba ni contracción ni hinchazón de las membranas ni de los núcleos de los espermatozoides, sin diferencias frente a los espermatozoides antes de la congelación. Sin embargo, en las espermátides, la morfología cambió de forma degenerativa en la cromatina, lo que sugiere que el núcleo de tales células está menos protegido durante el proceso de congelación y descongelación, que en las células más diferenciadas. Otra explicación puede ser que los espermatozoides más maduros tienen menos cantidad de citoplasma y la cromatina más condensada. Encontraron además que las estructuras más dañadas fueron los acrosomas.

Estos autores también reseñaron la importancia del método de congelación de los espermatozoides en el daño celular, propugnando la congelación lenta, en tres pasos, en vez la utilización de vapores de nitrógeno líquido.

Por otra parte, e independientemente del proceso de congelación, los espermatozoides testiculares son con frecuencia inmaduros. Nosotros hemos observado que muchos espermatozoides conservan la gota citoplasmática en su segmento intermedio como signo de inmadurez. Las especies reactivas de oxígeno en estos residuos citoplásmicos pueden afectar a la integridad del ADN y por ello, ser más difícil conseguir una buena supervivencia post descongelación.

Sería necesario no obstante la realización de más estudios que demostraran como las alteraciones ocurridas durante la congelación de espermatozoides de testículo pueden influir en la capacidad de fecundación y desarrollo embrionario en ICSI.

### **Movilidad de los espermatozoides testiculares**

Se conoce desde hace tiempo que los espermatozoides de mamífero (incluyendo los humanos), cuando se liberan desde los túbulos seminíferos permanecen inmaduros e incapaces de poseer movilidad progresiva. Los espermatozoides sufren el proceso de maduración y adquieren la movilidad progresiva cuando pasan a través del epidídimo, donde sufren cambios sustanciales de función, composición y organización (58). Cuando se empezaron a realizar las primeras biopsias de testículo con el fin de utilizar los espermatozoides para microinyección espermática, la primera sorpresa fue que los espermatozoides así obtenidos no necesitaban maduración previa en el epidídimo y eran capaces de fecundar un ovocito y generar un desarrollo embrionario y gestación normales (3,59). Sin embargo, la movilidad de los espermatozoides de testículo, una vez realizada la biopsia es baja, y con frecuencia los espermatozoides móviles sólo tienen una movilidad no progresiva. También en ocasiones es fácil no encontrar espermatozoides móviles tras la biopsia de testículo. Cabe resaltar que los resultados son distintos cuando se trata de azoospermias obstructivas que cuando son azoospermias secretoras.

En la mayoría de los casos es muy difícil encontrar suficientes espermatozoides móviles tras la biopsia para poder congelarlos. Algunos trabajos han publicado que, tras la obtención de los espermatozoides del testículo, la movilidad de estos es menos de un 3% (60). Sin embargo, y dadas las premisas anteriores de que los espermatozoides adquieren su movilidad en el epidídimo, conviene congelar las muestras aún cuando no encontremos espermatozoides móviles (40).

El problema se origina cuando tras descongelar las muestras de espermatozoides testiculares no se observa ningún tipo de movilidad. Ya que la microinyección de espermatozoides inmóviles resulta en bajas tasas de fecundación, se han utilizado varios métodos para inducir la movilidad de espermatozoides testiculares inmóviles.

El tratamiento químico más utilizado es la pentoxifilina. La pentoxifilina (PTF) inhibe la actividad de la fosfodiesterasa y de este modo aumenta los niveles de adenosín monofosfato (cAMP), una molécula que juega un papel en la motilidad espermática.

Mientras que Yovich et al (61) introdujo el uso de PTF en la práctica clínica de ART, Tasdemir y su grupo (62) fueron los primeros en mostrar su efecto sobre muestras de espermatozoides inmóviles. Debido a problemas de seguridad, la toxicidad embrionaria del PTF fue estudiado en un modelo de ratón. Esta investigación reveló varios eventos adversos que, sin embargo, podrían evitarse lavando los espermatozoides después de su exposición al PTF (63). Se encontró que la adición de PTF a los espermatozoides testiculares no solo inició la motilidad, sino que permitió la fecundación, embarazo y nacimiento de niños sanos después de ICSI (64). Se añadió PTF a la suspensión de esperma en una relación 1:1, con una concentración final de PTF de 3.6 mM. También cuando se congelaron-descongelaron muestras testiculares tratadas con PTF, se observó una motilidad significativamente mayor (65).

Otros grupos han utilizado distintos derivados de las xantinas como la teofilina (66), deoxiadenosina (67), cafeína (68) y relaxina (69) con resultados similares.

Aunque se han publicado algunos trabajos informado de los resultados normales de gestación utilizando estas sustancias (70,71), sigue preocupando la seguridad de estos compuestos químicos.

Otra de las pruebas utilizadas para evaluar la viabilidad de los espermatozoides de testículo inmóviles es el HOS test (hypo osmotic swelling). El HOS test informa sobre la funcionalidad espermática tras exposición a condiciones hipo osmóticas y comprobando la integridad de las membranas y se han publicado algunos trabajos con resultados comparables a la

microinyección de espermatozoides móviles (72). Sin embargo, los resultados falsos positivos y falsos negativos reducen la precisión de la prueba. Según Hossain et al (73), el método HOS no se puede considerar una alternativa completamente fiable debido al enrollamiento espontáneo de la cola en las muestras de espermatozoides en fresco (5,9%) y congeladas (6,7%).

La selección de espermatozoides por láser es una nueva técnica utilizada para identificar la viabilidad de espermatozoides inmóviles. En los espermatozoides vivos, la cola comienza a curvarse casi inmediatamente después de un solo disparo láser. Chen et al (74) ha informado de un embarazo con espermatozoides inmóviles de testículo tras congelación y descongelación, utilizando láser. El uso del láser tiene la ventaja de que no requiere ningún compuesto químico para inducir la motilidad, y por lo tanto puede ser considerado más seguro. El principal obstáculo para su aplicación generalizada sigue siendo el alto costo del equipo necesario.

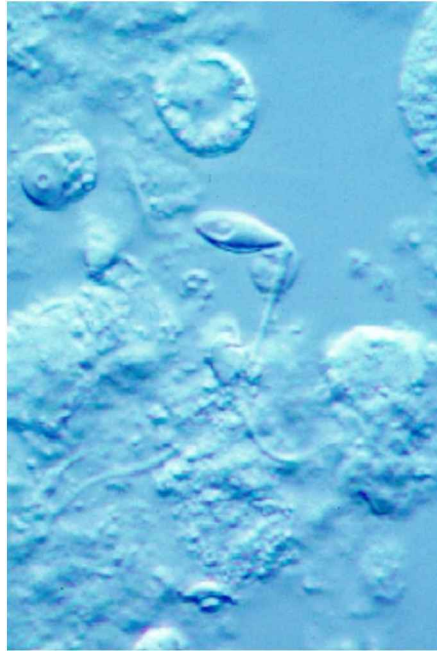
### **Cultivo de espermatozoides testiculares**

Como se ha comentado anteriormente, los espermatozoides testiculares son inicialmente inmóviles, pero muchos de ellos comienzan a adquirir movilidad después de mantenerlos algunas horas a 37°C. A lo largo del tiempo, los espermatozoides pueden optimizar su movilidad desde un movimiento flagelar a una movilidad progresiva. Por ello, muchos grupos han optado por el cultivo de espermatozoides testiculares para conseguir espermatozoides móviles maduros (28,75,76).

Estos cambios en los patrones de movilidad durante el cultivo in vitro de espermatozoides testiculares se han observado por varios autores (76). Además, se ha comprobado que el cultivo de espermatozoides testiculares ofrece los mismos resultados que la incubación con pentoxifilina y 2-deoxiadenosina, permitiendo evitar la utilización de estos compuestos químicos que pueden ser tóxicos (77).

El mecanismo implicado en la mejora de la movilidad de los espermatozoides testiculares tras cultivo permanece inexplicable, pero probablemente esté mediado por una compleja interacción entre las células germinales y somáticas. Tesarik y col (78) demostraron que los cambios en el movimiento de los espermatozoides podrían ocurrir sin estar en contacto con las células de Sertoli, por lo que la interacción estaría mediada por factores humorales. El grupo de Liu y col (28), encontró que la presencia de restos celulares y tejido testicular en las muestras de biopsia de testículo no solo no ejercen efectos adversos sobre la movilidad espermática, sino que son beneficiosos. Proponen que este tipo de condiciones de cultivo pudiera actuar como un sistema de co-cultivo, beneficioso para la maduración espermática.

Este hecho lo hemos podido comprobar desde el punto de vista práctico en el laboratorio al preparar las muestras de espermatozoides testiculares. A la vista de estos resultados, y de forma rutinaria, optamos por el procesamiento de las muestras de biopsia de testículo incubando los espermatozoides en suspensión en microgotas. Comprobamos también la evolución de la morfología espermática a lo largo del tiempo y observamos cómo el porcentaje de anomalías espermáticas va disminuyendo, sobre todo a partir de las 4 horas de incubación, donde pasamos de encontrar un 85% de morfoanomalías a un 68% a las 8 horas. La mayor parte de las morfoanomalías, en realidad, se deben al recuento de espermatozoides inmaduros, incluidos como morfoanormales (**Figura 8**). Esto incluye sobre todo engrosamiento del segmento intermedio y anomalías de cabeza. Al madurar con el tiempo, los espermatozoides pierden los restos citoplasmáticos y maduran, con lo que podemos seleccionar mejores espermatozoides para microinyectar (39). El grupo de Liu y col (28), en un ensayo similar, encontraron una mejoría morfológica de los espermatozoides a partir de las 72 horas de incubación.



**Figura 8.** Los criotubos se sumergen en nitrógeno líquido y posteriormente pasan al contenedor del banco.

La discrepancia surge cuando hay que definir el tiempo necesario de cultivo de los espermatozoides de testículo, y si es preferible incubar antes o después de la congelación. Desch y col (79), comprobaron que los mejores resultados se lograron cuando los espermatozoides testiculares se congelaron el día de la biopsia de testículo. Cultivaron durante 24 horas los espermatozoides, pero, a pesar de mejorar la movilidad, las 24 h adicionales de cultivo antes de la congelación tuvieron un efecto negativo en la tasa de fecundación e implantación, que fueron inferiores cuando se congelaron los espermatozoides tras 24 h de cultivo. Otros autores, sin embargo, indican que se obtienen mejores resultados incubando las muestras durante 72 horas antes de la congelación (80).

Por otra parte, la fragmentación del ADN en muestras de espermatozoides de testículo en varones con azoospermia obstructiva se ha demostrado que aumenta cuando se realizan períodos largos de incubación (81).

En nuestra experiencia, los mejores resultados se obtienen cuando incubamos los espermatozoides post descongelación (39). Nuestro estudio ha demostrado que después de unas horas de incubación, la movilidad mejoró significativamente, alcanzándose el máximo aproximadamente a las 6 h.

Además, los trabajos que han estudiado el efecto del cultivo de espermatozoides testiculares en su movilidad, bien sea antes o después de la congelación, se refieren a pacientes con azoospermia obstructiva. En nuestra experiencia en pacientes con azoospermia no obstructiva, el mejor método para obtener espermatozoides móviles es también el del cultivo tras la descongelación (40). Comprobamos que, en estos casos, la movilidad tras la descongelación de las muestras era menos del 2% por lo que es muy difícil encontrar espermatozoides móviles para ICSI. Sin embargo, después de algunas horas de cultivo, incluso sin espermatozoides móviles, la movilidad mejoró significativamente sin la necesidad de medios especiales o tratamientos químicos.

## **Resultados clínicos**

Desde la utilización de rutina de espermatozoides de testículo congelados y descongelados, se han publicado numerosos estudios comparando los resultados clínicos con los de biopsia de testículo en fresco para saber si la congelación reduce la tasa de gestación. Sin embargo, existe gran controversia en la literatura, ya que hay trabajos que no encuentran diferencias (15,82,83) y otros muestran una reducción de la tasa de éxito con la congelación (84-86). Esta discrepancia

puede deberse a la principal dificultad encontrada en los estudios, que es la randomización. Algunos pacientes optan por congelar las muestras por razones personales y en otros casos porque los resultados no fueron buenos con las muestras en fresco, lo que induce a pensar, erróneamente, que las muestras congeladas, en caso de embarazo, fueron mejores. Por lo tanto, hay que tener en cuenta los factores de confusión para llegar a una conclusión sobre la bondad del método.

Por otra parte, no existe una estandarización en cuanto a los métodos de congelación, descongelación y preparación de las muestras. Tampoco se tiene en cuenta si el diagnóstico inicial es azoospermia obstructiva o secretora, o el porcentaje de espermatozoides móviles encontrados. Todo ello hace que no exista una unanimidad de criterio en cuanto a los resultados obtenidos.

Para comprobar los resultados tras ICSI en función del método de procesamiento de los espermatozoides de testículo congelados y descongelados nuestro grupo analizó la influencia del tiempo y momento de incubación (antes y después de la congelación) de los espermatozoides testiculares en la tasa de fecundación, división embrionaria, calidad embrionaria, tasa de implantación y tasa de gestación en ciclos de ICSI (39)<sup>39</sup>. Los pacientes incluidos en este estudio estaban diagnosticados de azoospermia obstructiva, y se compararon los resultados utilizando muestras en fresco y congeladas. Los grupos de estudio fueron: grupo 1 (control) en el cual los espermatozoides testiculares en fresco se incubaron durante 4 h antes del ICSI; grupo 2 (los espermatozoides testiculares se incubaron durante 4-6 h antes de la criopreservación y se utilizaron para ICSI las muestras descongeladas), y grupo 3 (los espermatozoides testiculares empleados para ICSI se incubaron durante 4-6 h después de la descongelación). La movilidad de los espermatozoides aumentaba a lo largo del tiempo en los 3 grupos de estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de división, calidad embrionaria, gestación e implantación entre los 3 grupos. Sin embargo, la tasa de fecundación fue significativamente mayor en el grupo 3 (71,6%) y más baja en los grupos 2 (62%) y 1 (63,5%) ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente, realizamos otro estudio (40) con varones diagnosticados de azoospermia no obstructiva en los que no encontramos espermatozoides móviles tras la biopsia de testículo. Se recuperaron espermatozoides que se criopreservaron en cuarenta pacientes. En todos los casos se realizó un ciclo de ICSI con los espermatozoides descongelados (Grupo I) y se consiguieron dieciséis embarazos. Veinticuatro pacientes del grupo I se sometieron a tratamiento con el mismo lote de espermatozoides descongelados (Grupo II). Para el primer intento de ICSI, la inyección se realizó cuando se encontraron espermatozoides móviles. En el grupo II, la inyección se realizó cuando se alcanzó la motilidad máxima. Comparamos la media de la tasa de fertilización, la calidad del embrión, tasa de embarazo clínico y tasa de implantación de embriones.

El porcentaje medio de motilidad fue significativamente mayor en el grupo II que en el grupo I (18, 6 versus 8, 2). El grupo I mostró una disminución significativa en las tasas de fertilización en comparación con espermatozoides testiculares criopreservados en el grupo II (54% versus 72%,  $P < 0,05$ ). No se observó diferencia entre la tasa de división, calidad embrionaria, embarazo clínico y tasas de implantación entre los grupos II e I.

## **Conclusiones**

Como ya se ha mencionado previamente, la utilización de espermatozoides criopreservados procedentes de biopsias de testículo es un método cada vez más utilizado, con el cual se reduce el número de procedimientos requeridos para conseguir una gestación. Igualmente, los datos publicados hasta el momento con espermatozoides de testículo previamente congelados son similares a los manifestados con espermatozoides frescos de testículo. Sin embargo, y como hemos podido comprobar revisando la bibliografía, estos resultados en muchas ocasiones son dispares, no solo en cuanto al porcentaje de gestaciones sino a las tasas de fecundación y división embrionarias en estos ciclos.

Hay poca información en general sobre cómo afecta el proceso de congelación y descongelación a los espermatozoides de testículo y, hasta ahora, casi todos los trabajos

publicados en este sentido se han realizado comprobando los efectos de manera prospectiva. No existen muchas publicaciones que nos describan los cambios de conducta de los espermatozoides como respuesta a un daño criobiológico. En este sentido, creemos que el estudio de diferentes métodos de cultivo de espermatozoides, a diferentes tiempos, analizando evolución de la movilidad y morfología, así como comparando tasas de fecundación en ICSI, nos puede dar una idea de porqué podemos encontrar diferencias en los resultados que ofrece la literatura.

Un manejo más racional de las muestras de tejido testicular, en el caso de espermatozoides criopreservados, conllevaría una mejora en la movilidad espermática y mejor tasa de fecundación en ICSI.

En cualquier caso, recomendamos la criopreservación de espermatozoides testiculares tanto en azoospermias obstructivas como secretoras, antes de un ciclo de ICSI, para evitar sucesivas biopsias.

También es conveniente la criopreservación incluso si previamente no se encuentran espermatozoides móviles tras la biopsia, ya que pueden conseguirse realizando un cultivo post descongelación.

## Referencias

1. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int.* 1982; 20:9–10.2.
2. Franco G, Misuraca L, Ciletti M, Leonardo C, De Nunzio C, Palminteri E, et al. Surgery of male infertility: an update. *RU.* 2014; 81:154–64.
3. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993, 342,1237.
4. Devroey P, Liu J, Nagy Z et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI). *Fertility and Sterility*, 1994, 62,639–641.
5. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod.* 1999; 14:131–5.
6. Flannigan R, Bach PV, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction. *Trans Androl Urol.* 2017; 6:745–52.
7. Ishikawa T. Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia.
8. *Asian J Androl.* 2012; 14:109–15
9. Bernie AM, Shah K, Halpern JA, Scovell J, Ramasamy R, Robinson B, et al. Outcomes of microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril.* 2015; 104:569–573.e1.
10. Haimov-Kochman R, Lossos F, Nefesh I, Zentner B-S, Moz Y, Prus D, et al. The value of repeat testicular sperm retrieval in azoospermic men. *Fertil Steril.* 2009; 91:1401–3.
11. Liu J, García JE, Compton G, Katz E, Baramki TA. Pregnancy after use of frozen-thawed human testicular spermatozoa by using intracytoplasmic sperm injection [abstract]. 52nd Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, Boston, Massachusetts, November 2-6. 1996. p. S95
12. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*, First Edition: Martin Dunitz; 2001
13. Friedler S, Raziell A, Soffer Y. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular sperm in patients with nonobstructive azoospermia: a comparative study. *Fertility and Sterility* 1997,68, 892–895

14. Auki VW, Wilcox AL, Thorp C, Hamilton BD, Carrel DT. Improved in vitro fertilization embryo quality and pregnancy rates with intracytoplasmic sperm injection of sperm from fresh testicular biopsy samples vs. frozen biopsy samples. *Fertil Steril.* 2004; 82:1532-6.
15. Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS, Ross L. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000; 73:955-60.
16. Gil-Salom M, Romero J, Mínguez Y, Rubio C, de los Santos MJ, Remohi J, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 1996; 11:1309-13
17. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 11:28-36
18. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from 'solution effects' and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14:287-302
19. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347-369
20. Esmaeili, V., Shahverdi, A.H., Moghadasian, M.H., and Alizadeh, A.R. Dietary fatty acids affect semen quality: A review. *Andrology.* 2015; 3: 450-461
21. Watson P.F The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981,62:483-492.
22. Watson P.f. Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's Physiology of Reproduction 2: Reproduction in the male.* Edimburgo, 1990. pg. 747-869.
23. Graham E.F. The integrity of frozen spermatozoa. *Nationa Academy of Sciences,* 1978, 1-44.
24. Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 1974; 89:79-88.
25. Fisher P.S. and Fairfull R.W. The effecto of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Criobiology* 1986, 23: 141-49.
26. Spallanzani, L. Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. In *Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile, Opusculo II.* Modena, Italy. 1776.
27. Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature,* 1949.164, 666-676
28. Devroey P, Liu J, Nagy Z et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995, 10, 1457-1460.
29. Liu J, Tsai Y, Katz E, Comptom G, Garcia J and Baramki TA.- Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen-thawed human testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 12 1997. (8), 1667-1672.,
30. Hammitt DG, Walker DL and Williamson RA. Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm is dependent on cropresrvation medium. *Fertil Steril* 1988.,49, 680.7,



31. Sherman J.K. Cryopreservation of human semen. In Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. B.A, Keel and B.W. Webster eds. 1990,pp 229-60, Boca Raton: CRC-Press, Inc.
32. Schmell M.K. Vazquez I. and Graham E.F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to Test-yolk glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1986, 23, 512-17
33. Schiewe M.C, Rothman C, Spitz A, Werthman P.E, Zeitlin S.I, and Anderson R.E. Validation-verification of a highly effective, practical human testicular tissue in vitro culture-cryopreservation procedure aimed to optimize pre-freeze and post-thaw motility. *J Assist Reprod Genet* (2016) 33:519-528
34. Verheyen G, Nagy Z, Joris H et al. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertility and Sterility* 1997, 67, 74-80.
35. Kupker W, Schlegel PN, Al-Hasani S, et al. Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2000; 73:453-8.
36. Ragni G, Caccamo AM, Dalla Serra A, Guercilena S. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. *Fertil Steril.* 1990 Jun;53(6):1072-5.
37. Borini A, Sereni E, Bonu, Flamigni C. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA. *Mol Cell Endocrinol* 169 (1-2): 27-32, 2000.
38. Nagase H and Niwa T, Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. In V.I.C.A.R. Trento Vol 4, pp 410-15., . 1964.
39. Vazquez I. Martinez F, Alcaide M y Diaz Yubero C Congelación del semen de morueco. XI Jornadas Científicas de la S.E.O.C. pg 169.76. Palencia. (1987).
40. Núñez Calonge R, a Cortés Gallego S, Gago García M, García Segovia A, Peramo Moya B, Caballero Peregrín P. Optimización de los resultados de microinyección intracitoplasmática con espermatozoides congelados y descongelados procedentes de biopsia de testículo. *Rev Intern Andrologia*; 2007 [Vol. 5. Núm. 4.](#) pág 343-348
41. Nuñez-Calonge R, Cortes S, Gago M, López P, Caballero-Peregrin P. Increased fertilization rates after in vitro culture of frozen-thawed testicular immotile sperm in nonobstructive azoospermic patients. *ISRN Urol.* 2012; 2012:108576
42. Hammerstedt, R.H, Graham J.K, and Nolan J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.,. (1990).
43. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM 1999 The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 14, 505-511
44. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility* 2001, 76, 892-900

45. Nijs M, Ombelet W Cryopreservation of human sperm. *Human Fertility (Camb)* 2001, 4, 158–163.
46. Küpker W, Schlegel PN, Al-Hasani S et al. Use of frozen thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 2000. 73, 453–458.
47. Albertini DF, Olsen R. Effects of fertility preservation on oocyte genomic integrity.
48. *Adv Exp Med Biol* 2013; 761:19–27
49. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga PP. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fert* 1995; 26:145–148.
50. Tselkas K, Saratsis P, Karagianidis A, Samouilidis S. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2000; 107:69 – 72.
51. Wei YH. Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1998; 22:55–67.
52. McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod* 2010; 82:644–651
53. Kalweit S, Nowak C, Obe G. Hypotonic treatment leads to chromosomal aberrations but not to sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutat Res* 1990;245:5–9
54. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of
55. fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine
56. externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001; 22:646–651.
57. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod* 2004; 71:1167–1173
58. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2010; 93:1921–1928
59. Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston S, Gosálvez J. An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci.* 2012 Nov;19(11):1163-8.
60. Steele EK, McClure N, Lewis SE., Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertil Steril* 74 (3), 450-453, 2000.
61. Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC. Light, and Electron Microscopic Analysis of Human Testicular Spermatozoa and Spermatids from Frozen and Thawed Testicular Biopsies. *Hum Reprod.* 1999 Aug;14(8):2041-9.
62. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In Knobil E, Neill JD, Greenwald GS et al (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189-317., 1994.

63. Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J et al. Intracytoplasmic single sperm injection with testicular sperm cell. 1993, *Annalen*, 2, 8-10.
64. Wu B, Wong D, Lu S, Dickstein S, Silva M, Gelety TJ. Optimal Use of Fresh and Frozen-Thawed Testicular Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Azoospermic Patients. *J Assist Reprod Genet* 2005 Dec;22(11-12):389-94.
65. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL. Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertil Steril*. 1988;50(1):179-81.
66. Taşdemir I, Taşdemir M, Tavukçuoğlu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 1998;15(2):90-2.
67. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril*. 1994;61(6):1045-51.
68. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, et al. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet*. 2000;17(4): 194-9.
69. Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl*. 2006;27(1):45-52.
70. Ebner T, Tews G, Mayer RB, Ziehr S, Arzt W, Costamoling W, et al. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. *Fertil Steril*. 2011;96(6):1331-6.
71. Aitken RJ, Mattei A, Irvine S. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *Reproduction*. 1986; 78:515-27.
72. Stephens TD, BrooksRM, Carrington JL, Cheng L, CarringtonAC, Porr CA, et al. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *J Equine Vet Sci*. 2013; 33:615-21.
73. Miah A, Salma U, Schellander K. Roles of relaxin on in vitro sperm physiology. *Reprod Domest Anim*. 2015; 50:125-5.
74. Hattori H, Nakajo Y, Ito C, Toyama Y, Toshimori K, Kyono K. Birth of a healthy infant after intracytoplasmic sperm injection using pentoxifylline-activated sperm from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(7):56-65
75. Ebner T, Shebl O, Mayer RB, Moser M, Costamoling W, Oppelt P. Healthy live birth using theophylline in a case of retrograde ejaculation and absolute asthenozoospermia. *Fertil Steril*. 2014;101(2):340-3.
76. Stanger JD, Vo L, Yovich JL, Almahbobi G. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reprod BioMed Online*. 2010; 21:474-84.
77. Hossain A, Osuamkpe C, Hossain S, Phelps JY. Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and

- viability of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(2-3):83-6.
78. Chen H, Feng G, Zhang B, Zhou H, Shu J, Gan X. A successful pregnancy using completely immotile but viable frozen-thawed spermatozoa selected by laser. *Clin Exp Reprod Med.* 2017; 44:52-5.
  79. Craft, M Tsirigotis, J J Zhu, In-vitro Culture of Testicular Sperm; *Lancet.* 1995 Nov 25;346(8987):1438.
  80. Zhu J, Tsirigotis M and Craft I , In-vitro maturation of human testicular spermatozoa. *Hum Reprod.*, 11, 231-232., 1996.
  81. Angelopoulos T, Adler A, Krey L, Licciard Fi, Noyes N, McCullough A. Enhancement, or Initiation of Testicular Sperm Motility by in Vitro Culture of Testicular Tissue. *Fertil Steril .* 1999 Feb;71(2):240-3
  82. Tesarik J, Greco E, Rienzi L et al. Differentiation of spermatogenic cells during in vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinante follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13, 2772-2781, 1998.
  83. Desch L, Bruno C, Herbemont C, Michel F, Bechoua S, Girod S, Sagot P, Fauque P. Impact on ICSI Outcomes of Adding 24 H of in Vitro Culture Before Testicular Sperm Freezing: A Retrospective Study. *Basic Clin Androl .* 2015 Jun 9; 25:6
  84. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Verddoodt M and Englert Y. Increased sperm motility after in vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum Reprod* 15 (11): 2371-2374, 2000
  85. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SEM. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril.* 2004; 82:1443-5.
  86. Yu Z, Wei Z, Yang J, Wang T, Jiang H, Li H, Tang Z, Wang S, Liu J. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcome with fresh versus frozen-thawed testicular sperm in men with nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Jul;35(7):1247-1257.
  87. Ohlander S, Hotaling J, Kirshenbaum E, Niederberger C, Eisenberg ML. Impact of fresh versus cryopreserved testicular sperm upon intracytoplasmic sperm injection pregnancy outcomes in men with azoospermia due to spermatogenic dysfunction: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014; 101:344-9.
  88. Park YS, Lee S-H, Lim CK, Cho JW, Yang KM, Seo JT. Effect of testicular spermatozoa on embryo quality and pregnancy in patients with non-obstructive azoospermia. *Syss Biol Reprod Med.* 2015; 61:300-6.
  89. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2001; 59:451-8.
  90. Bin W, Wong D, Lu S, Dickstein S, Silva M, Gelety TJ. Optimal use of fresh and frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *J Assis Reprod Genet.* 2005; 22:389-94.

# MICRORROBÓTICA PARA EL MOVIMIENTO DE ESPERMATOZOIDES CONTROLADO EN FORMA REMOTA

Veronika Magdanz

Grupo Smart Nanobiodevices Instituto de Bioingeniería de Cataluña, Barcelona, España.

Autor corresponsal: Dr. rer.nat. Veronika Magdanz. Smart Nanobiodevices Group Institute for Bioengineering of Catalonia C. Baldiri Reixac 10-12, 08028 Barcelona. Tel. +34 934 020291. Correo electrónico: [vmagdanz@ibecbarcelona.eu](mailto:vmagdanz@ibecbarcelona.eu)

## Cápsula

Este capítulo presenta enfoques innovadores para abordar los desafíos en andrología. Los espermatozoides se emplean como fuentes de propulsión y carga para lograr la guía controlada a distancia, transporte, manipulación celular y entrega de espermatozoides.

## Desafíos en Andrología de Blancos de Microrrobótica

Este capítulo aclarará el impacto potencial de la microrrobótica en ciertos desafíos que enfrentan los laboratorios de Andrología de hoy. De hecho, la robótica de espermatozoides ha evolucionado desde campos completamente diferentes, como la nanotecnología, la ciencia de los materiales, la bioingeniería y la robótica. Durante las últimas dos décadas, los investigadores han desarrollado dispositivos a microescala que pueden funcionar como robots: se mueven de forma autónoma, se guían de forma remota y realizan las tareas deseadas. Una de las visiones detrás del desarrollo de estos microrobots es la miniaturización de las intervenciones médicas. Richard Feynman dibujó una imagen ilustrativa de esta visión para “tragarse al cirujano”, quien luego se movería dentro del cuerpo humano, encontraría el sitio enfermo y lo trataría o extirparía (1).

El objetivo de esta mirada es hacer que los tratamientos médicos no sean invasivos y ofrecer acciones altamente específicas mediante el uso de micro y nanorobots. La aplicación de micro-robots es especialmente interesante para la manipulación celular, la administración de células, la administración de fármacos y la biopsia. Se espera que la implementación de micro-robots eluda métodos invasivos como la cirugía, reduzca los efectos secundarios de las intervenciones médicas, disminuya la dosis de medicamentos y la circulación de medicamentos dentro del cuerpo, mediante la entrega de carga de forma activa y altamente dirigida.

¿Cómo pueden ayudar los microrobots en Andrología? Como probablemente pueda adivinar de los otros capítulos del libro, algunos de los principales desafíos en Andrología son la movilidad, la morfología o el número de espermatozoides deficientes. De ahí que la selección de los mejores espermatozoides y la fecundación asistida con pocos espermatozoides sean los objetivos principales. Aquí, la microrrobótica ofrece soluciones para la Andrología.

Específicamente, este capítulo describe cómo la micro-robótica brinda la oportunidad de

- Capturar espermatozoides únicos o múltiples
- Guiar los espermatozoides remotamente por campos magnéticos débiles
- Liberar los espermatozoides según la necesidad
- Transportar células inmóviles al ovocito
- Manipular bioquímicamente los espermatozoides

## ¿Qué es la Microrrobótica y cuál es el papel de los espermatozoides en ella?

Uno de los principales desafíos de la microrrobótica es encontrar fuentes de energía que funcionen de manera eficiente en microescala. Debido a las restricciones y a diferentes fenómenos físicos que rigen la escala pequeña, no se pueden implementar fuentes de energía convencionales (motores de combustión, baterías). Por lo tanto, los investigadores han implementado otras fuentes de energía, como la propulsión magnética, óptica, eléctrica, química o ultrasónica, solo por mencionar los principales ejemplos (2–5). Con vistas a las aplicaciones biomédicas, uno de los requisitos más importantes es la biocompatibilidad y la propulsión eficiente en ambientes fisiológicos. Por lo tanto, los científicos se han inspirado en la propulsión biológica, como se ve en los microorganismos o los espermatozoides, de dos maneras:

1. imitando el movimiento flagelar mediante la fabricación de elementos artificiales que se mueven de manera similar, pero que son accionados por fuentes de energía externas, como campos magnéticos (4,6)

o

2. incorporar las células móviles directamente con componentes artificiales para formar microrobots biohíbridos (7,8).

Los espermatozoides se incorporaron por primera vez en microdispositivos como fuentes de propulsión en el año 2013 (9). Gracias a la fuerza de propulsión fuerte de los espermatozoides, pueden transportar carga adicional (microobjetos, medicamentos), por lo que son componentes fascinantes de los microrobots híbridos (10). Por otro lado, los espermatozoides también pueden ser el cargamento de interés. Este es un punto importante cuando pensamos en la fecundación asistida en caso de oligozoospermia o astenozoospermia. En estos casos, la microfabricación se puede utilizar para crear dispositivos de transporte de espermatozoides que permitan la recogida, el transporte y la entrega de un único espermatozoide inmóvil (11). Además, gracias a la flexibilidad intrínseca de los espermatozoides, también se han utilizado como plantillas para microrobots magnéticos (12). El concepto y la fabricación de tales microrobots impulsados por espermatozoides, portadores de espermatozoides y con plantilla de espermatozoides, se explicarán en los siguientes párrafos.

### “*Spermbots*” o “espermatozoides robóticos”

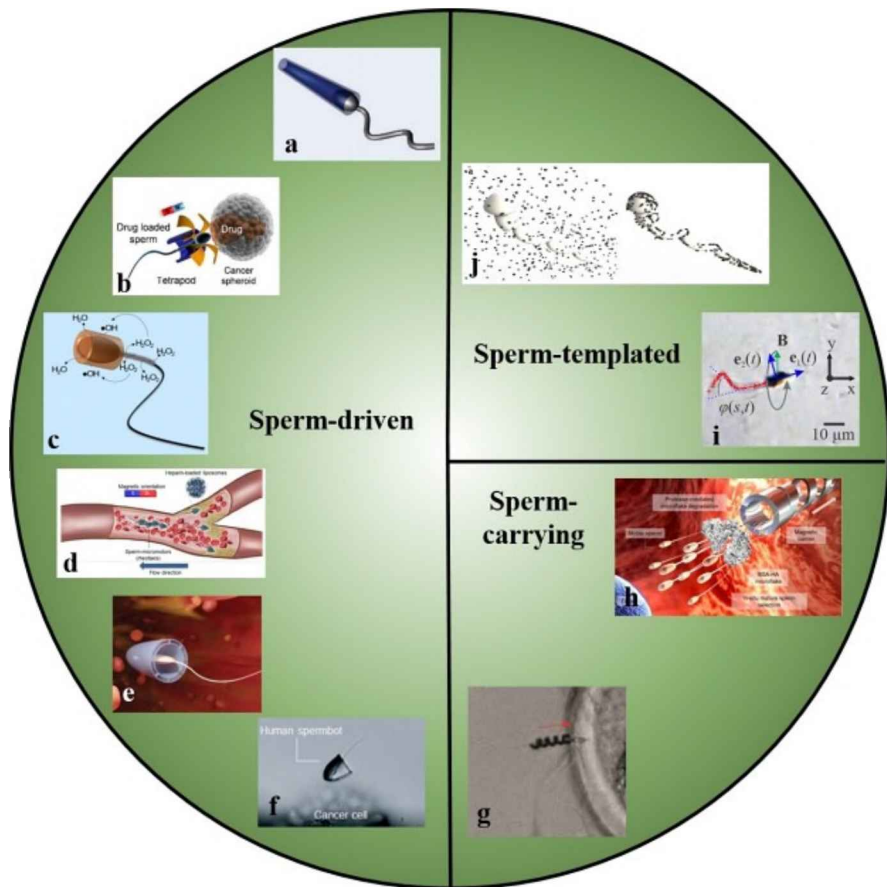
El término “*spermbots*” o “espermatozoides robóticos” fue mencionado por primera vez en el año 2013 por los medios que llamaron la atención sobre el primer microrobot impulsado por espermatozoides, que fue desarrollado en el Instituto de Nanociencias Integrativas 3 en IFW Dresden, Alemania (9).

En principio, el término se refiere a microrobots biohíbridos compuestos por espermatozoides y microestructuras artificiales. Hay diferentes tipos de ***spermbots*** o **espermatozoides robóticos** que se han demostrado hasta ahora, y que se describirán en detalle aquí.

### Microrobots impulsados por espermatozoides

Los microrobots impulsados por espermatozoides son microestructuras impulsadas por espermatozoides móviles. Una forma muy conveniente de usar la fuente de propulsión de los espermatozoides es capturar las células por la cabeza y dejar que la cola se mueva libremente y empuje la microestructura hacia adelante. Para capturar espermatozoides, se ha demostrado que los micro-túbulos que se ajustan a la cabeza del espermatozoide funcionan bien para ese propósito. Los microtúbulos se fabrican mediante nanotecnología enrollable (13) y son lo suficientemente pequeños para que las células queden atrapadas y no se escapen de los tubos. Específicamente, los microtubos ferro-magnéticos ofrecen un método para la captura y control remoto de células móviles por campos magnéticos externos. Mediante el uso (13) se ajustó el

tamaño de nano-membranas enrolladas de 50  $\mu\text{m}$  de largo para adaptarse a espermatozoides bovinos individuales (9) (**Figura 1a**).



**Figura 1.** Descripción general de los robots de esperma, incluidos los microbots impulsados por espermatozoides, que transportan espermatozoides y con plantillas de espermatozoides. para la protección contra el estrés oxidativo y la maduración in situ de los espermatozoides (17) d) Microrobots impulsados por espermatozoides que nadan contra el torrente sanguíneo (24) e) Microrobots impulsados por espermatozoides en el líquido del oviducto (19) f) Tapones impulsados por espermatozoides humanos para la administración de fármacos (25), g) un solo espermatozoide (11) y h) múltiples portadores de espermatozoides (20) i) Espermatozoides activados magnéticamente que se asemejan al movimiento móvil de los espermatozoides (23) j) Microrobots magnéticos flexibles con plantillas de espermatozoides obtenidos por autoensamblaje de partículas magnéticas y espermatozoides (12,26).

Luego, cuando se sumergieron en una suspensión de espermatozoides bovinos, las células móviles entraron al azar en los microtúbulos enrollados, quedaron atrapadas mecánicamente y comenzaron a empujar los microtubos hacia adelante. Las nanomembranas enrolladas contenían una capa de hierro del grosor de un nanómetro, que permitía el control direccional remoto magnético de los microrobots impulsados por espermatozoides mediante pequeños campos magnéticos de unos pocos miliTesla (14). En comparación con el espermatozoide libre, los microtubos impulsados por espermatozoides mostraban una velocidad reducida en alrededor del 80% debido al confinamiento físico de la célula, que restringe el movimiento de flexión de los flagelos. Para mejorar el desempeño de tales microrobots híbridos, se fabricaron y usaron microtubos enrollados más cortos (20  $\mu\text{m}$  de largo) para el acoplamiento con los espermatozoides (15). Esto mantuvo una mayor velocidad de los robots biohíbridos, pero el éxito del acoplamiento fue menor, debido a que los espermatozoides pueden escapar a través de los microtubos cortos con mayor frecuencia. A continuación, se aplicaron métodos de funcionalización de la superficie para llevar las proteínas de unión a los espermatozoides a la superficie interna de los microtubos para aumentar la unión de los espermatozoides (15). La proteína de la matriz extracelular fibronectina se revistió en el interior de los microtubos mediante química enlazadora o mediante impresión por microcontacto. Esto logró una mayor tasa de éxito de acoplamiento entre los espermatozoides y los microtubos. La limitación de usar hierro y titanio como materiales para microtubos es que el microtubo no puede cambiar su forma, por lo que la liberación controlada no

fue posible en este primer enfoque. La liberación de espermatozoides se logró mediante la incorporación de una capa de polímero termosensible en los microtubos de Ti/Fe.

Los polímeros termosensibles como la poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAM) pueden responder a cambios pequeños de temperatura mediante el colapso de su red de hidrogel para lograr un gran cambio de forma. En el caso de PNIPAM, a temperaturas por debajo de su temperatura de solución crítica más baja, es hidrofílico y absorbe una gran cantidad de agua. Por lo tanto, su volumen es grande. Cuando la temperatura aumenta por encima de la temperatura crítica más baja de la solución, el hidrogel se contrae abruptamente, porque cambia de un estado hidrofílico a un estado hidrofóbico. Este proceso es altamente reversible y la temperatura de respuesta puede ajustarse mediante comonomeros en la red de polímeros (16). El cambio de forma de la capa de hidrogel se convirtió en un mecanismo de apertura/cierre de los microtubos al agregar una capa pasiva de hierro en la parte superior. Esto permitió, primero, la captura de células en los tubos de hidrogel enrollados, segundo, el control remoto magnético y, finalmente, la liberación de las células mediante un pequeño aumento de temperatura (16). Otro enfoque tenía como objetivo fabricar microrobots biodegradables impulsados por espermatozoides para manipulación bioquímica de espermatozoides con pH controlado *in situ*. Se fabricó un tipo de microestructura biodegradable mediante polimerización basada en plantilla de gelatina dentro de los poros de una membrana de policarbonato (17). Esto dio como resultado estructuras de gelatina de 15  $\mu\text{m}$  de largo similares a cartuchos que respondieron a campos magnéticos débiles, gracias a las nanopartículas magnéticas incrustadas (**Figura 1c**). Los microcartuchos de gelatina capturaron espermatozoides bovinos individuales, que impulsan las estructuras bajo la guía direccional de los campos magnéticos. La biocompatibilidad de las microestructuras se demostró mediante el cocultivo con células de adenocarcinoma endometrial humano y la degradación se logró mediante niveles fisiológicos de tripsina (17). También se emplearon microrobots impulsados por espermatozoides para la administración de fármacos, que se describirá con más detalle en la Sección 4.3. Para este enfoque, se fabricó una microestructura diseñada en 3D que podía capturar espermatozoides móviles cargados de fármacos y liberarlos mediante un gatillo mecánico en su extremo frontal de cuatro brazos (**Figura 1b**) (18). Los micro-robots también se probaron en condiciones fisiológicas, como nadar a través del fluido del oviducto (**Figura 1e**) (19).

Estos fluidos corporales altamente viscoelásticos muestran una viscosidad de varios órdenes de magnitud más alta que el medio celular estándar, en el que los espermatozoides generalmente se manipulan en el laboratorio de Andrología. Por lo tanto, para evaluar la capacidad de los microrobots impulsados por espermatozoides para moverse a través de fluidos corporales tan complejos se probó *in vitro*. El fluido del oviducto bovino de la fase lútea temprana se caracterizó en términos de su reología y se sugirió un medio sustituto que contenía metilcelulosa al 0,2 % para imitar estas propiedades del fluido *in vitro*. Se estudió la velocidad de los micromotores impulsados por espermatozoides con tapas aerodinámicas y, aunque se observó una reducción de la velocidad, los “*spermbots*” aún podían propulsarse con velocidades de alrededor de 50  $\mu\text{m/s}$  (19).

### **Microrobots portadores de espermatozoides**

Los espermatozoides inmóviles se pueden motorizar capturándolos en microhélices adaptadas y aplicando campos magnéticos giratorios para su propulsión hacia adelante (**Figura 1g**) (11). Se fabricaron microhélices con fotorresistencia mediante nanolitografía 3D y posteriormente se recubrieron con níquel. Ésto permite un accionamiento magnético giratorio preciso que da como resultado un movimiento similar al de un tornillo hacia adelante y hacia atrás que permite la recogida y liberación de las células espermáticas inmóviles. Este enfoque es especialmente prometedor para la entrega de espermatozoides inmóviles pero viables al ovocito. Este método tiene perspectivas en reproducción asistida para tratar ciertos tipos de astenozoospermia (baja o nula motilidad de los espermatozoides). Las microhélices magnéticas no solo se utilizaron para el transporte de espermatozoides no móviles, sino también para el transporte múltiple de espermatozoides móviles. Los espermatozoides móviles primero se unieron selectivamente a una microcopa de albúmina y ácido hialurónico y luego este copo cargado de espermatozoides fue transportado por un micromotor helicoidal accionado por campos magnéticos giratorios externos (**Figura 1h**) (20). La microcopa de albúmina y ácido hialurónico se usó como punto de selección para unir espermatozoides móviles de alta calidad y luego fue degradado enzimáticamente en el sitio de entrega por la acción del ácido hialurónico en el sistema reproductivo. Esta degradación de la microcopa condujo a la liberación de espermatozoides funcionales.



## Plantilla de espermatozoides

El flagelo de los espermatozoides tiene una flexibilidad intrínseca con una rigidez a la flexión que varía a lo largo de la cola. Esto da como resultado un movimiento ondulatorio de flexión flexible de la cola que da como resultado una propulsión eficiente de la celda, incluso en entornos altamente viscosos. Esto ha inspirado a los investigadores a utilizar espermatozoides inmóviles como plantillas para la fabricación sencilla de micronadadores magnéticos flexibles (**Figura 1j**). La fabricación se basó en el autoensamblaje impulsado electrostáticamente de micro o nanopartículas magnéticas y la superficie del espermatozoide. Se encontró que la carga de la superficie de los espermatozoides no es uniforme y, por lo tanto, se obtienen diferentes "mapas de carga" mediante la unión de nanopartículas con diferente carga en la membrana (21).

Esto resultó en cantidad y localización de partículas magnéticas diferente en cada membrana celular. En primer lugar, se aplicaron campos magnéticos planos y ondulatorios con el uso de cuatro bobinas electromagnéticas (22). Esto resultó en una pequeña velocidad de avance de las construcciones de partículas de espermatozoides. Además, la flexibilidad de la plantilla del espermatozoide no se pudo mantener de manera óptima, porque las micropartículas de 1  $\mu\text{m}$  perjudicaron la flexibilidad de la cola del espermatozoide. En un estudio siguiente, se usaron partículas de óxido de hierro más pequeñas y alargadas de 100 nm para el autoensamblaje con el espermatozoide. Esto mantuvo la flexibilidad de la cola del espermatozoide de una manera mejorada (12). La aplicación de un campo magnético giratorio tridimensional dio como resultado un movimiento de flexión flexible del nadador magnético con plantilla de espermatozoides. La frecuencia aplicada y los ángulos de cono se pueden utilizar para controlar su movimiento hacia adelante y su rendimiento general. Al comparar los mecanismos de natación de los espermatozoides activados magnéticamente con los espermatozoides móviles, las formas de onda resultantes diferían entre sí (**Figura 1i**) (23). Los espermatozoides activados magnéticamente se caracterizan por una linealidad más baja, una asimetría más alta y una progresión hacia adelante más baja que sus contrapartes móviles. La fuerza de empuje calculada por la teoría de la fuerza resistiva es mayor en el caso de las células móviles en comparación con el espermatozoide accionado magnéticamente. Esto nos lleva a la conclusión de que todavía hay mucho que aprender de los mecanismos de movimiento biológico de los espermatozoides. El estudio de tales sistemas es útil para mejorar el diseño de microrobots biohíbridos flexibles.

## Aplicaciones

### Aplicaciones en Andrología

Los robots de espermatozoides pueden realizar varias tareas prometedoras relevantes para la Andrología. Aquí, discutimos los que se han implementado hasta el momento, que incluyen la captura de espermatozoides, el control direccional remoto, la liberación controlada a distancia, la manipulación bioquímica y la acción antioxidante. Se pueden imaginar otras aplicaciones en el futuro, como la detección sobre la marcha y el diagnóstico de espermatozoides para seleccionar las células más aptas para la reproducción asistida.

### Guía remoto de espermatozoides

Una de las aplicaciones que han logrado todos los tipos de robots espermáticos es el guiado remoto de espermatozoides mediante campos magnéticos externos. Hasta ahora, esto solo se ha logrado *in vitro*, pero cuando se combine con técnicas de imagen apropiadas, en el futuro el control remoto se podrá implementar *in vivo*. La ventaja de utilizar campos magnéticos para el control remoto de espermatozoides es que no son invasivos, presentan una buena penetración a través de cualquier tejido y no son dañinos para el cuerpo humano. La seguridad del campo magnético se puede garantizar porque se aplican baja frecuencia (1-100 Hz) y baja intensidad de campo magnético (en el rango de miliTesla).

### Liberación de espermatozoides

La liberación de los espermatozoides capturados es importante, por un lado, para fines de fecundación asistida, en la que los espermatozoides deben entregarse en el lugar de la fecundación y, por otro lado, para la liberación de los espermatozoides cargados de fármaco en el

lugar del tratamiento del cáncer. La liberación de los espermatozoides se ha logrado hasta ahora por tres vías:

- i) apertura de la microestructura mediante el despliegue de microtubos que libera la célula confinada. Se utilizó la incorporación de material termosensible y un pequeño cambio de temperatura para abrir los microtubos enrollados (16).
- ii) un mecanismo de liberación mecánica al tener 4 brazos flexibles en el extremo frontal de la estructura de captura de esperma. Al chocar con un obstáculo, un gatillo mecánico dobló los brazos de la estructura de tetrápodos para permitir que los espermatozoides nadan por la abertura frontal (18).
- iii) liberación enzimática de espermatozoides móviles de una microcopa de albúmina y ácido hialurónico por proteasas y hialuronidasas (20).

### **Manipulación bioquímica *in situ* de espermatozoides**

Los microcartuchos de gelatina biodegradable mencionados anteriormente (17) también mostraron una funcionalidad avanzada que se utilizó para la manipulación *in situ* de espermatozoides. Otra característica beneficiosa de la gelatina es su respuesta al pH y esta propiedad puede aprovecharse para la administración de fármacos desencadenada por el pH. Los espermatozoides tienen que viajar a través de fluidos con un amplio rango de pH (desde aproximadamente pH 4-pH 8) desde el fluido seminal a través de la vagina, el cuello uterino y el útero hasta las trompas de Falopio. La respuesta de pH de la gelatina se puede utilizar para cargar fármacos a pH 5 y liberarlos cuando se alcanza pH 8. Por lo tanto, se emprendió un enfoque para demostrar que los espermatozoides pueden ser capacitados *in vitro* bajo demanda, mediante la liberación de heparina de la microestructura. La heparina es un agente activador de los espermatozoides que se sabe que induce la capacitación, un paso crucial en la maduración de los espermatozoides antes de la fertilización. El objetivo de este enfoque era demostrar que la capacitación de los espermatozoides se puede lograr mediante la liberación *in situ* de heparina activada por el pH desde las estructuras de captura de espermatozoides. La heparina no solo induce la capacitación, sino que también tiene un efecto positivo en el movimiento de los espermatozoides. Los resultados mostraron no solo que la velocidad de los spermabots cargados con heparina aumentó de 14  $\mu\text{m/s}$  a 20  $\mu\text{m/s}$ , sino que también se elevó la cantidad de capacitación del 22 % al 40 % de las células a pH 8 (17).

### **Protección contra el estrés oxidativo**

Estas estructuras de gelatina también mostraron un efecto de captación de oxígeno reactivo. Se sabe que los péptidos muestran actividad antioxidante y eliminan radicales altamente reactivos. La generación de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilos, inducen daño oxidativo. Ésta es una de las principales causas del daño de los espermatozoides durante la manipulación *in vitro* y reduce la vida útil de los espermatozoides *in vivo* e *in vitro*. El efecto antioxidante de las estructuras de gelatina se probó determinando la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en muestras con y sin microcartuchos de gelatina. En presencia de microestructuras de gelatina, el peróxido derivado de células se redujo enormemente en más del 90 % (17). Por lo tanto, se ha demostrado que los microrobots basados en gelatina sirven como agentes protectores contra el estrés oxidativo.

#### 4.1.5. Actuación de espermatozoides inmóviles

La actuación de espermatozoides inmóviles es de interés en el caso de astenozoospermia (baja o nula motilidad espermática). Cuando los espermatozoides no pueden moverse lo suficientemente rápido o no muestran motilidad, los microrobots pueden servir como dispositivos de transporte. Como se describió anteriormente, las microestructuras en espiral que giran en un campo magnético externo y realizan un movimiento similar al de un tornillo, se pueden usar para transportar espermatozoides individuales (11). Los campos magnéticos giratorios se aplican para capturar las células, conducir las a la ubicación objetivo y suéltelas con un movimiento de rotación hacia atrás. Otro enfoque consiste en utilizar partículas magnéticas y unir las directamente a la membrana de los espermatozoides mediante interacción electrostática. Estos espermatozoides cubiertos de partículas pueden activarse mediante campos magnéticos giratorios u oscilantes que dan como resultado un movimiento ondulatorio similar al de los espermatozoides vivos (12). Desafortunadamente, hasta ahora, esto solo se ha demostrado para los espermatozoides bovinos muertos, que luego se utilizaron como microrobots flexibles con plantillas de espermatozoides.

## **Obtención de imágenes *in vivo* de enjambres de espermatozoides**

Los beneficios adicionales de unir nanopartículas a los espermatozoides se ofrecen para la obtención de imágenes *in vivo*. Las nanopartículas magnéticas mejoran en gran medida la ecogenicidad de las células, lo cual es un requisito previo para obtener buenas imágenes por ultrasonido. Las imágenes por ultrasonido se basan en el reflejo de las ondas sonoras del tejido u objeto que se va a detectar. Cuando se logra una gran diferencia entre la ecogenicidad del objeto de interés y el entorno circundante, se obtiene una imagen de buen contraste. Con la ayuda de nanopartículas de óxido de hierro adheridas, se pueden detectar enjambres de espermatozoides con ultrasonido (12). Hasta ahora, esto solo se ha demostrado *in vitro*, pero parece prometedor para la obtención de imágenes *in vivo* de enjambres de espermatozoides en movimiento. El ultrasonido es una modalidad estándar de imágenes médicas que está disponible en la mayoría de las clínicas y se ha demostrado que es biológicamente segura y no invasiva.

## **Aplicaciones en fecundación asistida**

### **Entrega de cigoto**

Se aplicó un concepto similar a los microrobots que transportan espermatozoides para transportar cigotos murinos *in vitro* con una microhélice helicoidal mediante campos giratorios magnéticos externos (24). En este caso, el robot tenía una forma espiral adaptada al tamaño y la forma de los óvulos fecundados murinos. Este enfoque promete proporcionar mayores tasas de éxito de transferencia de embriones *in vivo* en el futuro.

## **Otras aplicaciones biomédicas**

### **Administración de fármacos dirigidos contra el cáncer en el tracto reproductivo**

En un enfoque fuera de la Andrología, pero médicamente relevante, se exploró el potencial de los microrobots impulsados por espermatozoides para la terapia contra el cáncer (25). Los espermatozoides bovinos se cargaron con el clorhidrato de doxorrubicina, el noveno fármaco contra el cáncer. Sorprendentemente, la motilidad de los espermatozoides cargados de fármaco no se vio afectada. Luego, las microestructuras poliméricas nanoimpresas en 3D se recubrieron con una capa de hierro y titanio y se usaron para capturar espermatozoides de toro cargados de fármacos (18). Si bien los espermatozoides actuaron como fuente de propulsión, se usaron campos magnéticos débiles para la guía direccional de espermatozoides a esferoides de cáncer que demuestran la idoneidad del sistema para aplicaciones de administración de fármacos. La microestructura impresa en 3D contenía un frente de cuatro brazos que ofrecía un mecanismo mecánico de liberación de células. Como siguiente paso, se exploró el semen humano para la administración de fármacos. A pesar de que cargan cantidades más pequeñas de fármaco por célula (debido a su menor volumen), se demostró con éxito que actúan como robots de administración de fármacos (26). Se capturaron múltiples espermatozoides humanos cargados con fármaco en microestructuras huecas semielipsoides. Para aumentar el efecto terapéutico, el fármaco anticanceroso CPT se inmovilizó en la microestructura artificial. Luego, se capturaron hasta tres espermatozoides humanos en la tapa aerodinámica, se guiaron y se entregaron a esferoides de cáncer de ovario derivados de pacientes *in vitro* (26).

### **Movimiento contra el torrente sanguíneo**

Los espermatozoides tienen muchas habilidades fascinantes, como su respuesta a diversos estímulos externos (27). Los gametos masculinos pueden redirigir su movimiento en respuesta a gradientes químicos, gradientes térmicos, interacciones superficiales y flujo de fluidos. El último se denomina reotaxis y se refiere a la capacidad de la célula para nadar contra el flujo de fluidos (28). Esto se exploró en un estudio para evaluar la capacidad de los espermatozoides de nadar contra el torrente sanguíneo en un entorno de chip (29).

Se diseñaron y fabricaron microcápsulas tubulares con litografía de dos fotones con un diámetro de 13  $\mu\text{m}$  y recubiertos con material magnético para permitir la guía remota de los motores híbridos de espermatozoides. Se capturaron espermatozoides bovinos dentro de las microcápsulas y se probó su capacidad de natación en un chip de microfluidos con flujo de fluido aplicado similar a las tasas de flujo sanguíneo fisiológico. Los espermatozoides capturados mostraron la capacidad de nadar contra el flujo de fluidos de sangre diluida y, además, administrar

heparina como agente anticoagulante mediante liposomas adheridos a las microcápsulas. No solo se formaron microcápsulas de espermatozoides individuales, sino también "trenes" de microcápsulas mediante el autoensamblaje de las microcápsulas. Los trenes de microcap de espermatozoides proporcionan un suministro múltiple de espermatozoides y una acción concertada. Este enfoque muestra potencial en el uso de espermatozoides como microrobots de propulsión y entrega para aplicaciones en vasos sanguíneos.

## Resumen y Conclusiones

Este capítulo tuvo como objetivo brindar una descripción general de un tema inusual pero emocionante en Andrología: microrrobótica que involucra gametos. Se demostró que los materiales novedosos y el desarrollo de tecnologías innovadoras están allanando el camino para aplicaciones avanzadas en andrología y 10 medicina reproductiva. Animo a los lectores a seguir los artículos originales de su interés y los avances actuales en el campo. Este es un campo en rápida evolución y vive de las contribuciones de una variedad de campos que van desde la medicina, la biología hasta la ciencia y la tecnología de materiales. Las aplicaciones microrrobóticas en andrología aún están en pañales y, como se explica en este capítulo, hasta ahora solo se han practicado en entornos de laboratorio. Sin embargo, se pueden esperar grandes contribuciones y transferencias a los entornos clínicos en el futuro. Para alcanzar el siguiente nivel de aplicaciones, se enfrentan ciertos desafíos. En primer lugar, las pruebas de biocompatibilidad y respuesta inmunitaria son de gran importancia. En segundo lugar, la obtención de imágenes precisas in vivo, la manipulación y el control remoto son de crucial importancia. Si estos desafíos se superan en el futuro, la guía, liberación, entrega de carga y reproducción asistida de esperma por control remoto se pueden implementar con la ayuda de *spermbots*.

## Referencias

1. Feynman RP. Plenty of Room at the Bottom. In: APS annual meeting. 1959.
2. Guix M, Mayorga-Martinez CC, Merkoçi A. Nano/Micromotors in (Bio)chemical Science Applications. Chem Rev [Internet]. 2014;114:6285–322.
3. Sonntag L, Simmchen J, Magdanz V. Nano- and Micromotors Designed for Cancer Therapy. Molecules. 2019;24:3410.
4. Palagi S, Fischer P. Bioinspired microrobots. Nat Rev Mater [Internet]. 2018;3:113– 24.
5. Erkoc P, Yasa IC, Ceylan H, Yasa O, Alapan Y, Sitti M. Mobile Microrobots for Active Therapeutic Delivery. 2019;1800064:1–18.
6. Peyer KE, Zhang L, Nelson BJ. Bio-inspired magnetic swimming microrobots for biomedical applications. Nanoscale [Internet]. 2013;5:1259–72.
7. Alapan Y, Yasa O, Yigit B, Yasa IC, Erkoc P, Sitti M. Microrobotics and Microorganisms: Biohybrid Autonomous Cellular Robots. Annu Rev Control Robot Auton Syst [Internet]. 2019;2:205–30. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-control-053018-023803>
8. Ricotti L, Trimmer B, Feinberg AW, Raman R, Parker KK, Bashir R, et al. Biohybrid actuators for robotics: A review of devices actuated by living cells. Sci Robot [Internet]. 2017 Nov 29;2:eaq0495.
9. Magdanz V, Sanchez S, Schmidt OG. Development of a Sperm-Flagella Driven MicroBio-Robot. Adv Mater [Internet]. 2013;25:6581–8.
10. Magdanz V, Medina-Sánchez M, Schwarz L, Xu H, Elgeti J, Schmidt OG. Spermatozoa as Functional Components of Robotic Microswimmers. Adv Mater [Internet]. 2017;29:1606301--n/a.
11. Medina-Sánchez M, Schwarz L, Meyer AK, Hebenstreit F, Schmidt OG. Cellular cargo delivery: Toward assisted fertilization by sperm-carrying

- micromotors. *Nano Lett.* 2015;16:555–61.
12. Magdanz V, Khalil ISM, Simmchen J, Furtado GP, Mohanty S, Gebauer J, et al. IRONSperm: sperm-templated soft magnetic microrobots. *Sci Adv.* 2020;6:eaba5855.
  13. Mei Y, Huang G, Solovev AA, Ureña EB, Mönch I, Ding F, et al. Versatile Approach for Integrative and Functionalized Tubes by Strain Engineering of Nanomembranes on Polymers. *Adv Mater* [Internet]. 2008;20:4085–90.
  14. Khalil ISM, Magdanz V, Sanchez S, Schmidt OG, Misra S. Biocompatible, accurate, and fully autonomous: a sperm-driven micro-bio-robot. *J Micro-Bio Robot* [Internet]. 2014;9:79–86.
  15. Magdanz V, Medina-Sánchez M, Chen Y, Guix M, Schmidt OG. How to Improve SpermBot Performance. *Adv Funct Mater* [Internet]. 2015;25:2763–70.
  16. Magdanz V, Guix M, Hebenstreit F, Schmidt OG. Dynamic Polymeric Microtubes for the Remote-Controlled Capture, Guidance, and Release of Sperm Cells. *Adv Mater.* 2016;28:4048–89.
  17. Ridzewski C, Li M, Dong B, Magdanz V. Gelatin microcartridges for on board activation and antioxidant protection of sperm. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3:1616– 27.
  18. Xu H, Medina-Sánchez M, Magdanz V, Schwarz L, Hebenstreit F, Schmidt OG. Sperm-Hybrid Micromotor for Targeted Drug Delivery. *ACS Nano* [Internet]. 2017;12:327–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.7b06398>
  19. Striggow F, Medina Sánchez M, Auernhammer GK, Magdanz V, Friedrich BM, Schmidt OG. Sperm-Driven Micromotors Moving in Oviduct Fluid and Viscoelastic Media. *Small.* 2020;2000213.
  20. Xu H, Medina-Sánchez M, Schmidt OG. Magnetic Micromotors for Multiple Motile Sperm Cells Capture, Transport, and Enzymatic Release. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2020;59:15029–37.
  21. Magdanz V, Gebauer J, Sharan P, Eltoukhy S, Voigt D, Simmchen J. Sperm-particle interactions and their prospects for charge mapping. *Adv Biosyst* [Internet]. 2019;3:1900061.
  22. Magdanz V, Gebauer J, Mahdi D, Simmchen J, Khalil ISM. Sperm-templated magnetic microrobots. In: *Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales (MARSS), International Conference on.* Helsinki: IEEE; 2019.
  23. Khalil ISM, Magdanz V, Simmchen J, Klingner A, Misra S. Resemblance between motile and magnetically actuated sperm cells. *Appl Phys Lett* [Internet]. 2020 Feb 10;116(6):63702.
  24. Schwarz L, Karnaushenko DD, Hebenstreit F, Naumann R, Schmidt OG, Medina-Sánchez M. Noninvasive Zygote Transfer: A Rotating Spiral Micromotor for Noninvasive Zygote Transfer (*Adv. Sci.* 18/2020). *Adv Sci* [Internet]. 2020;7:2070102. A
  24. Schmidt CK, Medina-Sánchez M, Edmondson RJ, Schmidt OG. Engineering microrobots for targeted cancer therapies from a medical perspective. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11:5618.
  25. Xu H, Medina-Sánchez M, Zhang W, Seaton MPH, Brison DR, Edmondson RJ, et al. Human spermBots for patient-representative 3D ovarian cancer cell treatment. *Nanoscale* [Internet]. 2020;12(39):20467–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/D0NR04488A>

26. Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - An unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:276–85.
27. Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol* [Internet]. 2013;23:443–52.
28. Xu H, Medina-Sánchez M, Maitz MF, Werner C, Schmidt OG. Sperm Micromotors for Cargo Delivery through Flowing Blood. *ACS Nano* [Internet]. 2020;14:2982– 13 93.

*Traducido, revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# VARICOCELE: MÁS ALLÁ DE UN TRASTORNO VASCULAR

Jesús Ricardo Lozano Hernández<sup>1</sup>

Alejo Rasguido<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Maimónides. Facultad de Ciencias de la Salud. Buenos Aires-Argentina. Centro de Biomedicina Reproductiva (CEBIOMER). Mérida-Venezuela. <sup>2</sup>Staff Urología de Centro Urológico Dr. Rasguido. Staff Andrología de Fertilía Medicina Reproductiva. Tucumán, Argentina.

Autor correspondiente: Dr. Jesús Ricardo Lozano Hernández. Correo electrónico: [jesusricardolozano@gmail.com](mailto:jesusricardolozano@gmail.com)

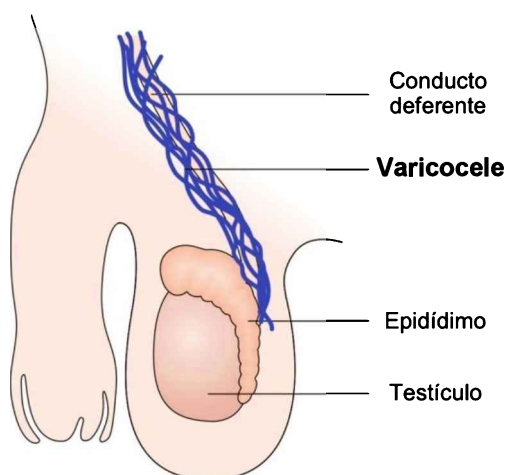
## Cápsula

Los cambios seminales más evidentes en el varicocele son descenso de la movilidad, con impacto en la membrana, el ADN espermático, en el epidídimo y en el flujo periprostático.

## Introducción

La infertilidad masculina es causada por diversos factores como las infecciones genitourinarias, los procesos inmunológicos, las anomalías genéticas, las toxinas gonadotóxicas, los desórdenes endocrinológicos, las enfermedades sistémicas, los tratamientos oncológicos y el varicocele. Este último por sí solo puede abarcar hasta un 35% de las causas, por lo que se considera como el principal causante de infertilidad en el hombre (Madgar *et al.*, 1995; Afsin *et al.*, 2018).

El varicocele es una dilatación de las venas del plexo pampiniforme, las cuales se vuelven tortuosas y alargadas, presentándose con mayor frecuencia en el testículo izquierdo (**Figura 1**). El plexo pampiniforme es una red de pequeñas venas que se encuentra en el cordón espermático y está constituido por tres grupos de venas que se anastomosan entre sí, la vena espermática externa (paquete anterior), vena deferencial y la pudenda externa (paquete posterior extrafunicular).



**Figura 1.** Presencia de las várices testiculares a lo largo del cordón espermático.

De acuerdo a la última versión de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010), la evaluación del semen humano en la práctica clínica se tornó controversial, ya que muchos pacientes considerados elegibles para la reparación quirúrgica, han dejado de serlo porque sus parámetros seminales se encuentran dentro de los rangos de referencia. Esto representa limitaciones en los procesos de aprobación de la cirugía para muchos de los que requieren la varicocelectomía (Esteves *et al.*, 2012), a pesar que se haya demostrado cambios significativos al comparar hombres con y sin varicocele (Ando *et al.*, 1990; Roaiah *et al.*, 2007).

La incidencia del varicocele es de 4-23% en la población general, de 21-41% en infertilidad primaria y de 75-81% en infertilidad secundaria (Witt y Lipshultz, 1993; Madgar *et al.*, 1995). La Organización Mundial de la Salud demostró que el varicocele se encuentra en el 25% de los hombres que tienen anomalías seminales y en el 11% de los sujetos con semen normal. Los cambios seminales más notables en la evaluación seminal son la reducción de la movilidad, de las formas normales y de la concentración espermática (Agarwal *et al.*, 2012; Kwon y Lee, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

Son muchas las incógnitas que surgen en relación al origen, fisiopatología y al grado de impacto en los parámetros seminales. También ha sido tema de debate si las oligozoospermias severas y las azoospermias requieren de la cirugía como tratamiento, así como el manejo terapéutico post operatorio. En este capítulo se describen experiencias de diferentes autores en relación a este trastorno vascular y puntos de discusión enfocados más allá del trastorno vascular.

## **Etiología**

La etiología del varicocele es multifactorial, principalmente por las diferencias anatómicas que existen entre la vena espermática derecha y la izquierda. En el testículo derecho la vena espermática tiene su inserción oblicua en la vena cava inferior, mientras que la vena espermática izquierda se inserta perpendicularmente en la vena renal izquierda. Se cree que la inserción en la vena renal izquierda produce incremento en la presión hidrostática, la cual es transferida al plexo pampiniforme causando dilatación de la misma. En segundo lugar se destaca que existen menos válvulas venosas competentes, lo que origina un reflujo sanguíneo venoso. Además, por una posible obstrucción parcial de la vena espermática puede ser causada por compresión de la vena renal izquierda, entre la aorta y la arteria mesentérica superior (Kathrins 2018). Por último, se cita el producto de una alteración mecánica de la bomba fascio-muscular (Ruiz Catañé *et al.*, 2018).

## **Fisiopatología del varicocele**

El daño causado por la dilatación venosa sobre la función testicular ha sido tema de discusión. Se han propuesto varias teorías al respecto con la finalidad de explicar sus efectos negativos sobre la espermatogénesis, los cuales se describen a continuación:

**a) Hipertermia:** La temperatura escrotal es regulada fisiológicamente para que se mantenga inferior a la corporal mediante un sistema de intercambio de calor que se describió por primera vez por Dahl y Harrick (1959). La temperatura del influjo de sangre arterial esparmatogénica es enfriada por el reflujo de la sangre venosa fría del plexo pampiniforme, es decir, que las várices del plexo pueden afectar el efecto de enfriamiento testicular (Mieusset *et al.*, 1987; Nakamura *et al.*, 1987; Nishiyama *et al.*, 1998). Se postula que las alteraciones en los parámetros seminales se acentúan con el tiempo de instaurarse las várices en el testículo donde la temperatura que se genera es determinante en el daño espermático (Chehval y Purcell, 1992).

**b) Flujo Sanguíneo Testicular:** Los estudios demuestran que ocurre un incremento bilateral del flujo sanguíneo testicular aun cuando el varicocele sea unilateral (Hurt *et al.*, 1986). El varicocele congestiona el sistema de drenaje venoso testicular y aumenta la presión hidrostática en la vena espermática, presentándose con mayor frecuencia en el testículo izquierdo. La presión hidrostática se transfiere al plexo pampiniforme, sobre todo cuando la presión venosa excede a la arteriolar en el sistema microcirculatorio testicular y se provoca un efecto hipóxico en el tejido. De esta manera



el flujo comienza a estancarse y como consecuencia, la sangre arteriolar oxigenada no fluye adecuadamente al testículo (Chakraborty *et al.*, 1985; Gat *et al.*, 2005).

Por otra parte, la porción intra-abdominal del drenaje venoso testicular es compleja, tiene un sistema interconectado de funcionamiento de las venas retroperitoneales, las cuales funcionan como un "bypass" (Vanlangenhove, 2018). Esta interconexión venosa está asociada con varicocele, es impalpable y se encuentra en el lado derecho. En el varicocele bilateral se ha observado que las venas palpables e impalpables causan el mismo efecto perjudicial en el testículo y pueden originar oligoastenoteratozoospermia de grado variable (Gat *et al.*, 2004). La afectación de ambos testículos por un varicocele unilateral podría comprometer mecanismos hormonales, apoptóticos o neuronales (Turner y Lopez, 1990; Turner *et al.*, 1993). Aunque no están claros los cambios de dirección del flujo sanguíneo testicular, es importante reconocer que un incremento del flujo sanguíneo testicular se correlaciona con la hipertermia testicular.

**c) Presión venosa:** El incremento de la presión puede afectar el riego y la microvasculatura testicular, esto se presenta debido a fallas en el mecanismo contra-regulador que se instaura para que se mantenga la homeostasis de la presión intratesticular. Se sabe que su persistencia condiciona la fijación anatómica de la flebectasia, hipoplasia de las fibras elásticas e hipertrofia de la capa media muscular de la pared venosa, de igual forma que ocurre con las varices de los miembros inferiores. El endotelio aislado de las venas varicosas espermáticas humanas tiene una respuesta contráctil diferente a fenilepinefrina, norepinefrina, serotonina e histamina en los diferentes grados, observándose mayor contracción en el grado III, de manera que a mayor grado de dilatación de las várices mayor es la disfunción endotelial (Yildiz *et al.*, 2003).

**d) Reflujo renal/adrenal:** Se ha establecido que en el 50% de los casos hay un flujo retrógrado en la vena espermática izquierda (WHO, 1992), de hecho, la venografía demuestra que existe incremento del reflujo venoso. La hipótesis que se establece al respecto es que el reflujo de productos metabólicos renal/adrenal (por ejemplo catecolaminas) se encuentra en grandes concentraciones en el testículo de individuos con varicocele. La consecuencia inicial es una vasoconstricción testicular crónica, lo que posteriormente puede perjudicar la función testicular (Scholler *et al.*, 1984; Hudson, 1996).

**e) Disfunción hormonal:** Las várices testiculares pueden aparecer desde los 12 años (Chung y Lee, 2018) y alcanzada la pubertad, los niveles séricos de LH, FSH, prolactina y testosterona son los mismos que del adulto pero con un ligero incremento en la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), lo cual descende la testosterona libre (Ishikawa y Fujisawa, 2004). En la etapa más madura de la adolescencia (etapa V de Tanner) las células de Leydig al ser estimuladas la LH producen menos testosterona que los adolescentes sin varicocele (Osuna *et al.*, 1999) y en adultos se describe una disfuncionalidad progresiva en las células de Leydig (Naughton *et al.*, 2001). Un estudio multicéntrico conducido por la OMS demostró que la testosterona en hombres con varicocele <math>\leq 30</math> años es más baja que en hombres más jóvenes con varicocele, por detrimento progresivo de las células de Leydig (Sirvent *et al.*, 1990).

Otra hormona, como el estradiol, se observó que se incrementa y se acompaña de oligoastenoteratozoospermia, porque hay mayor actividad aromatasa por parte de las células de Sertoli y se mantiene una relación inversa con la calidad espermática (Sevilla y Ruiz *et al.*, 1991). Otra hormona proveniente de las células de Sertoli la inhibina se correlaciona inversamente con el volumen testicular (Fujisawa *et al.*, 2001).

**g) Estrés Oxidativo.** En el hombre infértil se ha encontrado asociación entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) con el daño espermático. Los estudios señalan que las principales fuentes de ERO son: varicocele, consumo de tabaco, alcohol, obesidad/síndrome metabólico, leucocitospermia y enfermedades de transmisión sexual (Agarwal *et al.*, 2018). En estos sujetos los niveles de óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) se encuentran aumentados en las venas espermáticas y en el plasma seminal, lo que sugiere que pueden modular la función espermática. Bajas concentraciones de  $\text{NO}\cdot$  exógeno aumentan la movilidad, la viabilidad, la capacitación espermática

y la unión con la zona pelúcida; mientras que concentraciones altas de NO· disminuyen la movilidad e inducen mayor toxicidad espermática (Keyhan *et al.*, 2012). El NO· es un producto de oxidación de la arginina a la citrulina mediante la óxido nítrico sintasa (NOS). NO· juega un papel esencial en la relajación del tono del muscular liso arterial y en la destrucción de microorganismos patógenos. En estados patológicos el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el NO· interactúan en la producción del ión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual es un importante oxidante que ataca un gran número de blancos biológicos. El balance entre la producción de NO· y O<sub>2</sub><sup>-</sup> ha ayudado a explicar la etiología de daños por isquemia-reperusión en diversos trastornos patológicos (Carrizo *et al.*, 1998), de manera que el aumento de ERO en el semen de hombres con varicocele se asocia con pérdida de capacidad de los agentes antioxidantes presentes en el tracto reproductor masculino (Agarwa *et al.*, 2006). Las ERO rompen las cadenas simples y dobles del ADN, fragmentando diversas regiones cromosómicas menos en la porción telomérica (Lara-Cerrillo *et al.*, 2020).

**h) Autoinmunidad:** Las células de la progenie espermática están protegidas por la barrera hemato-testicular. Esta barrera está constituida principalmente por las uniones estrechas Sertoli-Sertoli y de células epiteliales interdigitadas en la rete testis, el epidídimo y los vasos deferentes, siendo una barrera más competente a nivel de los testículos. La diversidad de respuestas en el sistema inmunitario es extraordinaria y dentro de las especificidades expresadas por las poblaciones de células B y T se hallan muchas que van dirigidas contra los componentes propios del testículo (Vivas *et al.*, 2007). En el testículo varicoso pueden activarse mecanismos de autoreconocimiento contra los espermatozoides posiblemente por un defecto en la actividad supresora T que favorece la respuesta autoinmunitaria (Solis *et al.*, 2001). La presencia de anticuerpos antispermatozoides (AAE) se encuentra más elevada en suero y en plasma seminal en hombres infértiles con varicocele, se asocian con baja movilidad espermática, pero su presencia no es predictiva de éxito o fracaso en la varicocelectomía. Se sabe que títulos elevados de AAE se mantienen elevados antes y después de la cirugía teniendo el mismo efecto reductor de la movilidad espermática (Golomb *et al.*, 1986). Cuando la producción de espermatozoides es muy baja ocurre una serie de cambios en la secreción de citocinas y otros factores paracrinos intratesticulares que favorecen la colonización de microorganismos en el tracto genital, de manera que la bacteriospermia en varicocele no sería la causa principal de la baja calidad espermática sino más bien una consecuencia por el desbalance inmunológico testicular (Vivas-Acevedo y Lozano-Hernández, 2011). Con respecto a las infecciones genitales en varicocele se tiene que la presencia de microorganismos asociados a infertilidad masculina como *C. trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Escherichia coli* se encuentra en proporciones similares a los controles que no lo tienen y no es factor predisponente de infección genital a menos que la producción espermática se encuentre muy reducida (Golomb *et al.*, 1986; Vivas-Acevedo y Lozano-Hernández, 2011).

En la **Tabla 1** se resumen los cambios testiculares y las causas que predisponen cada condición.

**Tabla 1.** Mecanismos fisiopatológicos del varicocele.

Cambio	Causa
Hipertermia	Fallos en el sistema de enfriamiento del plexo pampiniforme.
Flujo Sanguíneo Testicular	Incremento del flujo sanguíneo testicular que aumenta la presión hidrostática de la vena espermática izquierda principalmente. Hipoxia en la microvasculatura testicular

<b>Presión venosa</b>	Disminución del mecanismo contrarregulador de la presión testicular
<b>Reflujo renal/adrenal</b>	Generación de reflujo de productos metabólicos renal/adrenal de catecolaminas y cortisol.
<b>Disfunción hormonal</b>	Disminución en la síntesis de testosterona (A menudo normogonadotrópicos) Aumento en la síntesis de estradiol Disminución en la inhibina
<b>Estrés oxidativo</b>	Aumento de óxido nítrico, reducción de agentes antioxidantes y producción de especies reactivas al oxígeno. Reducción del selenio.
<b>Autoinmunidad</b>	Formación de anticuerpos antiespermáticos y reducción de la movilidad espermática

### Impacto del varicocele en los parámetros seminales

MacLeod (1965) fue el primero en observar que había descenso en el recuento y la movilidad de los espermatozoides en hombres estériles con varicocele, describiendo además el aumento de la celularidad y de las formas espermáticas anormales caracterizando el conocido "síndrome de estrés espermático".

Al avanzar el tiempo aumenta la lesión vascular y la prevalencia de varicocele puede alcanzar hasta el 81% en la infertilidad secundaria (Gorelick y Goldstein, 1993; Chehval y Purcell, 1992).

Se ha demostrado que en el semen las características: volumen, formas normales, movilidad, vitalidad y test hiposmótico (HOST) tienden a ser más bajas con respecto a los normozoospermicos sin varicocele en las mismas edades (**Tabla 2**). Aunque el valor de leucocitos seminales es menor al límite de referencia inferior en varicocele (Pasqualotto *et al.*, 2000; WHO, 2010) son superiores a los controles (Blumer *et al.*, 2008). El incremento de leucocitos seminales en varicocele puede deberse a modificaciones en la barrera hemato-testicular por reducción en la expresión de E-cadherina y  $\alpha$ -catenina en las uniones entre las células de Sertoli adyacentes, lo que podría asociarse con pérdida de efectividad de la barrera (Koksal *et al.*, 2007), también porque el semen se forma por el aporte de las glándulas, el epidídimo y la próstata, estas estructuras también las principales fuentes de leucocitos (Simbini *et al.*, 1998). Se ha visto que hay infecciones seminales sin leucocitospermia por lo que debe revisarse sus valores de corte (Gdoura *et al.*, 2008).

**Tabla 2.** Características seminales de los individuos con varicocele al ser comparadas con hombres sin varicocele en los mismos rangos de edad.

Fuente: Urol Int. 2010;85 (2):194-199 .

	<b>Grupo total con varicocele</b>			
	<b>&lt; 20 años</b>	<b>21-30 años</b>	<b>31-40 años</b>	<b>&gt;40 años</b>
	<b>(n=65)</b>	<b>(n=166)</b>	<b>(n=97)</b>	<b>(n=35)</b>
<b>Volumen</b>	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia

Concentración /eyaculado	No cambia	No cambia	No cambia	No cambia
Formas normales	No cambia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	No cambia
Móviles Progresivos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HOST	<input type="checkbox"/>	↑	↑	↑
Leucocitos	↑	↑	↑	↑

El grado de varicocele: La mayoría de los parámetros por lo general se encuentran más alterados en los grados más II-III (Libman *et al.*, 2006; Richardson y Nagler, 2007). Las formas espermáticas normales se reducen más en el grado de dilatación III (Andrade-Rocha, 2007; Vahidi *et al.*, 2018). En los grados II-III el volumen testicular tiende a ser más bajo (Mori *et al.*, 2008).

Aún cuando reducción del volumen del testicular sea unilateral la intervención quirúrgica temprana sería oportuna porque con el tiempo tiende a comprometerse el testículo ipsilateral, generando lesiones importantes en ambos testículos (Osuna *et al.*, 1999).

Cambios macroscópicos seminales como la hiperviscosidad del semen (HVS) pueden ser frecuentes en el varicocele. Las muestras seminales hiperviscosas en estos sujetos tienen baja actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, por lo que el efecto peroxidativo es mayor (Siciliano *et al.*, 2001). Aunque su etiología de HVS es múltiple, en estos casos la causa se explica por disfunción prostática con dilataciones en el flujo vascular periprostático que se corrigen con la cirugía y reducen la viscosidad (Condorelli *et al.*, 2016; Lozano-Hernández *et al.*, 2019).

### Marcadores de las glándulas accesorias

Se ha considerado que las glándulas sexuales accesorias juegan un papel importante en la fisiología de los espermatozoides y la fecundación. Se ha informado de que la movilidad espermática puede estar influenciada por los componentes del plasma seminal (Zöpfigen *et al.*, 2000; Elzanaty, 2007). El semen está formado por fluido del testículo-epidídimo (<10%), de la próstata (20-40%); de las vesículas seminales (50-80%) y de las glándulas uretrales y bulbouretrales (<10%) (Ndovi *et al.*, 2007). Cada glándula aporta diferentes elementos en el eyaculado, varios de ellos específicos de un tejido. Carnitina,  $\alpha$ -glucosidasa neutra (AGN) y glicerofosocolina provienen del epidídimo; citrato, zinc y fosfatasa ácida prostática de la próstata; y fructosa y prostaglandinas se forman en las vesículas seminales (Said *et al.*, 2009; Lozano-Hernández, 2018a).

**Cambios en las glándulas accesorias:** Se ha demostrado que el zinc puede reducirse, que la relación fructosa/zinc se relacionaba con astenozoospermia y fallos en el drenaje venoso en el plexo vesico-prostático, sugiriendo que los productos de secreción prostática pueden afectar la movilidad (Ando *et al.*, 1990) y complicarse con el tiempo. En el 53% de los hombres >40 años con varicocele II-III hay mayor prevalencia de hiperplasia prostática benigna (Han *et al.*, 2016) y después de los 50 años los niveles del antígeno prostático específico (PSA) seminal guardan una relación inversa con el volumen seminal y con el recuento espermático. El PSA guarda relación directa con los niveles de interleucina-6 e inversamente con la calidad seminal en estos individuos, lo que sustenta la asociación entre próstata y calidad seminal (Ausmees *et al.*, 2014). Como el PSA es el principal ejecutor de la fragmentación de las semenogelinas, disuelve el coágulo del semen y activa la movilidad espermática, las semenogelinas pueden afectar la actividad de la hialuronidasa y la movilidad espermática, lo que demuestra una asociación más allá de la simple licuefacción del semen (Gupta *et al.*, 2017). Cabe destacar que la dilatación venosa de la próstata permite mayor suministro venoso de la testosterona libre y estimula así a las células de esta glándula. La hormona llega así a través del sistema de drenaje venoso, acelera la tasa de producción celular y alarga la vida útil de la célula, lo que favorece el desarrollo de hiperplasia prostática benigna (Goren y Gat., 2018). El ácido cítrico proveniente de la próstata tiene función antioxidante y despierta el interés en evaluar otros agentes antioxidantes provenientes de la

próstata y de otras glándulas. Hacemos referencia al selenio, el cual favorece la espermatogénesis y desempeña un papel antioxidante mediante la actividad de la glutatión peroxidasa y la selenoproteína (Rotruck, y Pope, 1973,). En animales de experimentación se ha evidenciado que la deficiencia de selenio reduce el tamaño de los testículos y su deficiencia prolongada produce atrofia en el epitelio seminífero y fallas en la maduración en el epidídimo (Zhou *et al.*, 2017). En modelos animales con varicocele se ha observado disminución de los parámetros espermáticos, en la actividad de enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. La administración de selenio ha mejorado significativamente los parámetros seminales casi a niveles normales protegiendo la citoarquitectura testicular (Taghizadeh *et al.*, 2017) y puede disminuir los niveles séricos de PSA en el cáncer de próstata (Karunasinghe *et al.*, 2019). En muestras seminales de sujetos con varicocele, el selenio se encuentra reducido y guardan asociación con la concentración espermática, la movilidad y la morfología espermática (Camejo *et al.*, 2011).

Las evidencias sugieren mayor compromiso de la próstata sobre las demás glándulas. El modelo de varicocele en ratas muestra que el epidídimo disminuye su peso y su diámetro tubular, presentando alteraciones morfológicas de las células principales con mayor grado de apoptosis (Zhang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006, Ozturk *et al.*, 2008), con aumento del factor inducible por hipoxia (HIF- $\alpha$ ) (Wang *et al.*, 2008), almacena espermatozoides más deformes, acumula macrófagos en el lumen y baja la actividad de la AGN (Zhang *et al.*, 2003).

Un estudio encontró que el marcador epidídimo se encontraba reducido en todos los grados de varicocele (Vivas *et al.*, 2011) y puede ser un marcador confiable de la inflamación testicular-epididimaria. Es necesario recalcar que la epididimitis crónica es más frecuente en el varicocele grado III (Oliva y Multigner, 2018).

Con respecto a las vesículas seminales se ha encontrado correlación negativa entre el número de espermatozoides móviles y la concentración de fructosa (mg/mL) (Lewis-Jones *et al.*, 1996), otro estudio no encontró ninguna asociación (Andrade-Rocha, 1990), y un tercer estudio demostró más bien una relación positiva (Said *et al.*, 2009), de manera que la relación fructosa y movilidad sigue siendo controversial.

Pocos estudios señalan que existe una asociación importante de los marcadores glandulares varicocele. Dentro del varicocele el marcador más confiable es la AGN; sin embargo, al relacionar los marcadores glandulares entre si se aprecia que guardan correlación con varias características del semen, ver **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Correlación entre marcadores de glándulas sexuales accesorias y parámetros seminales en sujetos con varicocele. AGN: alfa glucosidasa neutra. HOST: Test hipoosmótico. Fuente: Can J Urol. 2011;18:5884-5889.

Marcador	Correlación directa
↓ Fructosa (mg/eyaculado)	↓ Volumen
	↓ Concentración espermatozoides/eyaculado
	↓ Fosfatasa ácida /eyaculado
	↓ Zinc ( $\mu$ mol/eyaculado)

↓ Zinc (μmol/eyaculado)	↓ Volumen
	↓ Concentración espermatozoides/eyaculado
	↓ Movilidad progresiva
↓ AGN (mU/eyaculado)	↓ Morfología normal
	↓ Movilidad progresiva
	↓ Vitalidad
	↓ HOST

## Tests espermáticos

**a) Integridad del ADN espermático:** La 5ª edición del manual de la OMS muestra rangos muy bajos de normalidad, donde muchas muestras sobre los límites de referencia inferior tienen fragmentación del ADN espermático (Simon y col. 2011). Se ha demostrado que la fragmentación del ADN guarda relación inversa con la función epididimaria mediante la actividad de AGN y con el porcentaje de leucocitos seminales (Vivas-Acevedo *et al.*, 2011).

**b) Unión al ácido hialurónico:** El test de unión espermática al ácido hialurónico (HBA) evalúa la madurez de la membrana donde los espermatozoides maduros se unen al ácido hialurónico. Los gametos que han completado la espermatogénesis han presentado remodelación de la membrana, extrusión de la gota citoplasmática, remplazo nuclear de las histonas por protaminas y no han sufrido la reacción acrosómica. Este test se ha correlacionado con algunos parámetros seminales (morfología normal, movilidad, viabilidad y test hipoosmótico) y no se correlaciona con el volumen ni la concentración espermática. También HBA guarda relación inversa con los leucocitos seminales y con la fragmentación del ADN espermático (Huszar *et al.*, 2003).

Las hialuronidasas son una familia de enzimas que catalizan la degradación del ácido hialurónico, el cual es abundante en la matriz extracelular. Las evidencias indican que pueden tener funciones diversas durante la fecundación, penetración del cúmulo, unión a la zona pelúcida y como receptor al ácido hialurónico (Martin-Deleon, 2011). Una de hialuronidasas descritas en el espermatozoide ha sido la SPAM1 (o PH-20), la cual es captada por el espermatozoide en el paso por el testículo y el epidídimo y se ha asociado con la capacidad de penetrar la matriz de cúmulo ovocitario (Chen *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2009). El test HBA evalúa la movilidad espermática en cámara húmeda donde se cuentan los espermatozoides con movilidad y cabeza unida al ácido hialurónico (Ye *et al.*, 2006) y se encuentra significativamente reducido en los varicocele grados II-III (Vivas-Acevedo y col, 2014).

En la **Tabla 4** se presentan resultados de la unión del espermatozoide al ácido hialurónico (Halosperm) y del test de fragmentación SCD. En todas las categorías de SCD evaluadas se presenta un incremento de la fragmentación del ADN en el grupo con varicocele.

Hemos visto que no solo el testículo está involucrado en el varicocele, sino el epidídimo, el cual sería una glándula intra-escrotal que recibe sustancias provenientes del testículo varicoso. Las funciones del epidídimo son reguladas por andrógenos testiculares y por factores luminales provenientes del testículo, retetestis y conductillo eferentes como también factores externos como infecciones y altas temperaturas (Turner y Riley, 1999). Las "células principales

epididimarias" son metabólicamente activas, producen ERO como también antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa 5 y glutatión transferasa) y no enzimáticos (taurina y glutatión) (Castellón *et al.*, 2005). La producción de antioxidantes por el epidídimo es esencial para contrarrestar la producción excesiva de ERO originada localmente o en tránsito desde los testículos (Jarow *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2012).

**Tabla 4.** Correlación entre parámetros seminales, □- glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico y test de fragmentación del ADN. Fuente: British Jour Urolog Int. 2014;113(4):642-469.

Estudio de correlación	HBA	Fragmentación del ADN
↑pH	↓	↑
↑ Volumen (mL)	No cambia	↓
↑ Concentración /eyaculado	No cambia	No cambia
↑Morfología espermática (Kruger %)	↑	↓
↑ Movilidad (%)	↑	↓
↑Espermatozoides vivos	↑	↓
↑PMN/eyaculado	↓	↑
↑HOST (%)	↑	↓
↑AGN (mUI/eyaculado)	↑	↓
↑Índice de fragmentación SCD (%)	↓	-

Es posible que las citocinas pro-inflamatorias y los radicales libres liberados en el testículo varicoso afecten negativamente la función epididimaria. También se ha observado un incremento de la apoptosis en el epidídimo en ratas castradas, la cual es mayor a nivel de la cabeza que en las regiones proximales de este órgano (Fan y Robaire, 1998) y parece estar relacionada con las secreciones provenientes del testículo, retetestis y tubos rectos las cuales tienen mayor contacto con las regiones proximales (Turner y Riley, 1999). Se han identificado factores lumicrinos que tienen actividad antiapoptótica cuyos receptores se localizan específicamente en las células epiteliales de la cabeza del epidídimo (Wade *et al.*, 2002).

El daño al ADN causado por estrés oxidativo se acompaña de reducción de la actividad mitocondrial y de la integridad del acrosoma (Saleh *et al.*, 2003; Blumer *et al.*, 2008). Se han descrito los mecanismos que pueden provocar daño al ADN nuclear y mitocondrial, especialmente durante el transporte a través del epidídimo, sobre todo en la cauda y al estar suspendidos en el eyaculado (Ollero *et al.*, 2001; Greco *et al.*, 2005).

La hipoxia y el estrés térmico en el varicocele pueden provocar incremento en la producción de ERO por las células principales, causando daño en las células del epidídimo y en los espermatozoides durante el proceso de maduración (Wang *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2016).

### Opciones terapéuticas

Desde hace décadas se ha destacado que la corrección quirúrgica del varicocele ha mejorado los parámetros seminales en un 50% a 80% de los casos (Lome y Ross, 1977; Marks *et al.*, 1986) y la tasa de embarazo se han alcanzado entre 31% y 71% (Scott y Young, 1962; Madgar *et al.*, 1995; Machen *et al.*, 2019). Dado que parte de los hombres con varicocele son fértiles, no se justifica en todos los casos la varicocelectomía. Se recomienda la reparación quirúrgica en

varicocele doloroso en los grados II - III y cuando hay disminución del tamaño testicular ipsilateral. Aunque es un tema de debate, se ha reportado que la corrección quirúrgica mejora los parámetros seminales en sus grados más avanzados (Steckel *et al.*, 1993). La reparación quirúrgica del varicocele es beneficiosa no solo para corregir la infertilidad asociada al estrés oxidativo, sino también para evitar el efecto progresivo del estrés oxidativo sistémico. (Hamada *et al.*, 2013). El abordaje más aconsejable actualmente es la ligadura microquirúrgica por vía subinguinal reduciendo las complicaciones como el hidrocele, el daño de los vasos arteriales y las recidivas. A los 3 meses de la intervención, se aconseja realizar un estudio doppler de control así como un seminograma (Protocolos de la Fundación Puigvert, 2018). Se ha encontrado que en el varicocele disminuyen los antioxidantes del plasma seminal. Los mecanismos fisiopatológicos inducidos por estrés oxidativo en varicocele todavía no se han entendido completamente, pero ERO han emergido como un paso muy importante en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los hombres que asisten a las clínicas de fertilidad (Moazzam, 2016).

Se ha observado mejoría es notoria en aquellos hombres que antes de la cirugía la concentración espermática se encontraba por debajo de  $40 \times 10^6$ /mL. Particularmente, la corrección quirúrgica del varicocele subclínico o del grado I refleja muy pocas mejorías en los parámetros seminales cuando la concentración espermática pre-operatoria es superior a  $40 \times 10^6$ /mL (Tinga *et al.*, 1984; Yarboroug *et al.*, 1989; McClure R *et al.*, 1991; Marmar, 2016). Una revisión detallada de los estudios de la varicocelectomía confirma su efectividad al reducir el daño del ADN espermático inducido por estrés oxidativo en varicoceles palpables (Roque y Esteves, 2018).

El suministro de antioxidantes luego de la varicocelectomía ha sido recomendado. Se sugiere que para evaluar la terapia antioxidante en hombres infértiles con tratamiento quirúrgico y con varicocele no tratados deben hacerse ensayos bien diseñados (Hamada *et al.*, 2013). En un grupo de sujetos con varicocelectomía subinguinal al ser tratados con vitamina E +selenio +ácido fólico durante seis meses, los parámetros seminales mejoraron significativamente con respecto al grupo no tratado (Ardestani Zadeh *et al.*, 2019). Cambios positivos en el líquido seminal se han observado después de la varicocelectomía, con el uso de productos naturales antioxidantes ricos en polifenoles (Lozano-Hernández *et al.*, 2019).

A pesar de la fuerte evidencia de los beneficios potenciales de la reparación del varicocele, no se han realizado estudios controlados aleatorios adecuadamente diseñados para definir los beneficios exactos de la varicocelectomía en los hombres con posibles indicaciones "alternativas" de cirugía de varicocele (Schlegel y Goldstein, 2011).

En los varicoceles subclínicos se recomienda solicitar al menos dos espermogramas en un transcurso menor a los tres meses y confirmar que los niveles de FSH no se encuentren elevados antes de la cirugía, de ser posible solicitar la medición sérica de inhibina B como un marcador confiable de la actividad espermatogénica (Dadfar *et al.*, 2010). Hasta el presente la cirugía debe ofrecerse a hombres infértiles con un varicocele palpable y con parámetros seminales anormales como lo sugieren las actuales Guías de la Asociación Americana de Urología y la Asociación Europea de Urología con respecto al tratamiento. Desafortunadamente, no hay ensayos prospectivos aleatorizados disponibles de tamaño, duración y validez estadística suficientes para considerarse absolutamente definitivos sobre el tema de la varicocelectomía para la infertilidad masculina (Leslie *et al.*, 2019). No obstante, los estudios de las condiciones clínicas o paraclínicas de los individuos que alcanzaron mejoría de los parámetros seminales después de la corrección quirúrgica deben conocerse.

### **Factores predictivos de éxito de la varicocelectomía**

Diversos factores se han definido como predictivos de recuperación quirúrgica del varicocele. Condiciones como la obesidad, las características del semen y algunas hormonas han sido debatibles en este aspecto. En la **Tabla 5** se destacan los parámetros que se han considerado predictivos de éxito tras la intervención quirúrgica en diversos estudios.

**Tabla 5.** Factores predictivos de éxito en la varicocelectomía. \*Hipoespermatogénesis es un parámetro predictivo favorable para la cirugía.



Prueba sugerida	Valor predictivo favorable
Índice de masa corporal	25-35 Kg/m <sup>2</sup>
Volumen testicular total	<input type="checkbox"/> 29,6 mL
Edad del paciente	≤37 años
Relación neutrófilos/linfocitos sanguíneos	≤ 1,69
FSH en normozoospermicos y oligozoospermicos FSH en Azoospermicos	< 11 mUI/mL < 17 mUI/mL
Inhibina B	<input type="checkbox"/> 72 pg/mL
Concentración de espermatozoides	5-40 x10 <sup>6</sup> /mL
Concentración de espermatozoides progresivos	> 5 x10 <sup>6</sup> /eyaculado
<b>Predictores de éxito para micro-TESE</b>	
Patrón de la biopsia testicular	Hipoespermatogénesis*
Hormona antimülleriana	<4.62 ng/mL
Relación HAM/Testosterona	<1.02
Testosterona total	>3,9 ng/mL

### Edad y masa corporal

El varicocele avanza con el tiempo de haberse instaurado y la edad máxima sugerida para la cirugía ha sido debatible (Vivas-Acevedo *et al.*, 2010). Al compararse los resultados de los parámetros seminales entre hombres jóvenes (<37 años) con respecto a hombres menos jóvenes (≥37 años), las mejoras postoperatorias en la concentración y la movilidad fueron más notables en los más jóvenes. En este sentido, la edad avanzada desfavorece la recuperación postoperatoria en el recuento total de espermatozoides móviles (Kimura *et al.*, 2017).

Los factores etiológicos de la infertilidad pueden ser únicos o asociados, incluyendo los factores metabólicos (Lozano-Hernández, 2018b), sobre todo cuando hay elevada adiposidad en quienes la calidad espermática es más baja (Lozano-Hernández *et al.*, 2017). En adultos con y sin sobrepeso la frecuencia del varicocele es la misma (Míguez *et al.*, 2019) e independientemente del valor del IMC, la varicocelectomía en pacientes con sobrepeso y obesidad parece ofrecer mejorías probablemente por reducción del impacto metabólico. Aunque no se ha hallado una explicación convincente, en los sujetos con bajo IMC, las recidivas en ellos son mayores. En cualquiera de los

casos, el peso corporal no es una condición restrictiva para recurrir a la varicocelectomía (Pham y Sandlow, 2010; Gorur *et al.*, 2015).

## **Hormonas y marcadores sanguíneos**

La varicocelectomía inguinal izquierda o bilateral en hombres oligozoospermicos muestra mejorías en la concentración espermática y en la movilidad en un 57% de los casos. Un análisis de regresión logística sugirió que la FSH preoperatoria en suero y la concentración de testosterona ayudan a predecir la recuperación en la concentración espermática (Kondo *et al.*, 2009). La falla testicular en cuanto a la producción espermática de forma significativa se manifiesta como oligoastenozoospermia o azoospermia (Masterson y Ramasamy, 2018), e independientemente del grado de varicocele, el efecto pernicioso puede afectar ambas gónadas (Pasqualotto *et al.*, 2005). En cuanto a los niveles de corte de FSH y de concentración espermática resumidos en el cuadro 5 se muestran solo los rangos menos restrictivos. Se tiene que el valor sugerido para FSH preoperatoria debe ser inferior a 11,3 mIU/mL (Dadfar *et al.*, 2010). En los grados más avanzados II –III se postula que quienes tienen concentración espermática  $> 8 \times 10^6$ /mL con una movilidad progresiva  $>18\%$  presentan mejoras notables por cirugía (Shabana, *et al.*, 2015). Con respecto al logro del embarazo se observó que los alcanzaron primero quienes tenían cifras mayores de concentración y movilidad (Peng *et al.*, 2015), por lo que la calidad espermática muy reducida debe ser exhaustivamente evaluada para identificar sus causas en cualquiera de los casos. Otro estudio propone que los hombres con varicocele con concentración de espermatozoides progresivos  $\geq 5$  millones/ eyaculado logran mejorías notables en la calidad espermática y en alcanzar el embarazo (Matkov *et al.*, 2001).

Si enfocamos el aspecto hormonal, al analizar las concentraciones de inhibina B se ha observado que mejoraron la calidad espermática post cirugía en un 60% quienes tenían los niveles más altos en los pre operatorios (Fujisawa *et al.*, 2001), señalando que los rangos predictivos favorables para inhibina B antes de la cirugía  $> 72$  pg/mL (Ballesca *et al.*, 2000). Con respecto al volumen testicular total (derecho+izquierdo) recomendado para garantizar mejores resultados post quirúrgicos se recomienda que un valor sumatorio  $\leq 29,6$  mL como otro posible predictor de éxito (Dadfar *et al.*, 2010).

Aunque no se encuentra una asociación directa del estudio hematológico con la actividad espermatógena, otro posible predictor de éxito citado es la relación neutrófilos/linfocitos (N/L) en sangre, que es un dato más considerado como indicador de la inflamación sistémica. Tomando en cuenta el efecto de la inflamación en el éxito de la varicocelectomía, se calculó esta relación previa a la cirugía y a los 6 meses post operatorios. La relación N/L preoperatoria  $\leq 1,69$  mostraron mayor recuperación. Los resultados de este estudio sugieren que la inflamación sistémica afecta negativamente la probabilidad de mejoría en los parámetros espermáticos post- varicocelectomía (Ates *et al.*, 2019).

## **Azoospermia en el varicocele**

Para los procesos de reproducción asistida se requiere de una concentración espermática mínima requerida para la manipulación de los gametos (Lozano-Hernández *et al.*, 2014). El tratamiento de los pacientes con varicocele y con azoospermia no obstructiva sigue siendo controvertido. Se sugiere que ante la presencia de dolor escrotal y riesgo de disfunción testicular se recurra a la varicocelectomía (Schlegel y Goldstein M, 2011). El varicocele se encuentra en 5-10% de los pacientes azoospermicos y pocas evidencias respaldan la eficacia de la varicocelectomía en ellos. La producción de espermatozoides después de la cirugía permite que mediante las técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se ofrezca como nueva alternativa aunque la tasa de éxito no supera el 10% (Chiba *et al.*, 2016).

Mediante microTESE o microcirugía realizada con amplificación visual microscópica (microscopio quirúrgico) se han podido obtener espermatozoides del tejido testicular en aquellos túbulos seminíferos más engrosados y más blanquecinos. Niveles de la hormona antimulleriana (HAM)  $<4.62$  ng/mL y la relación HAM/Testosterona  $<1.02$ , han resultado ser valores predictivos

de éxito de alta precisión para la obtención de espermatozoides por microTESE (Alfano *et al.*, 2017).

Los únicos azoospermicos que presentan recuperación pos varicocelectomía son los que tienen un patrón histológico de hipoespermatogénesis, la cual se demuestra mediante por biopsia testicular; casos como síndrome de Sertoli solo y otros diferentes a hioespermatogénesis no ofrecen alternativas de éxito (Elbardis *et al.*, 2019). Si el valor de FSH es  $\leq 17$  mUI/mL en un azoospermico se puede considerar falla espermatogénica severa y no es recomendable la cirugía (Souza *et al.*, 2003).

## Conclusiones

Antes de recurrir a la corrección quirúrgica en un varicocele asintomático infértil, debe conocerse la situación reproductiva de la pareja, no olvidar considerar las posibilidades gestacionales de la mujer como su edad, años de duración de la esterilidad, permeabilidad tubárica, ausencia de severas disfunciones ovulatorias, etc. Asimismo, la ovulación y la permeabilidad tubárica deben ser investigadas. Si éstas u otras funciones reproductivas femeninas no están resueltas debe aplazarse la decisión para el tratamiento (Corral y Balleca, 2012).

Los hallazgos generales indican que el varicocele puede ocasionar daños no sólo a nivel del testículo sino también del epidídimo, afectando la actividad de AGN, la calidad del núcleo y la membrana espermática, lo que finalmente puede afectar la fertilidad masculina.

Los grados más altos del varicocele tienen mayor impacto en la calidad del semen. El porcentaje promedio de espermatozoides con morfología normal se reduce en grado III, mientras que los otros parámetros parecieran no verse afectados.

Concentraciones espermáticas  $\leq 5$  millones/eyaculado sugieren que se realice la evaluación pre-operatoria endocrina de FSH, testosterona e Inhibina B, así como el registro del volumen testicular para tener unas expectativas más claras de los resultados.

La reparación del varicocele para aliviar el dolor ofrece una tasa de resolución significativamente alta pero en condiciones de éxito desfavorables, las técnicas de reproducción asistida son la única opción de recuperación espermática.

El papel complementario de la varicocelectomía antes de la reproducción asistida y la disminución significativa en la fragmentación del ADN espermático después de la reparación del varicocele merecen estudios minuciosos.

## Dedicatoria

En honor a los colegas Giovanni Vivas † (Ph.D) y Mari Isabel Camejo † (Ph.D) quienes fueron grandes maestros en la medicina reproductiva y guiaron las publicaciones que sustentaron parte esencial de este escrito. A la Dra. Judith Velasco que ha apoyado todos estos proyectos sin interés alguno.

## Referencias

1. Afsin M, Otludil B, Dede O, Akkus M. An examination on composition of spermatozoa obtained from pre-operative and post-operative varicocele patients. *Reprod Biol.* 2018;18(4):361-367
2. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol* 2012; 9: 678-690
3. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(5):630-633
4. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia.* 2018;50(11):e13126. doi: 10.1111/and.13126.

5. Agarwal A, Sharma R, Harlev A, Esteves SC. Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl.* 2016;18(2):163–170
6. Alfano M, Ventimiglia E, Locatelli I, Capogrosso P, Cazzaniga W, Pederzoli F, Frego N, Matloob R, Saccà A, Pagliardini L, Viganò P, Zerbi P, Nebuloni M, Pontillo M, Montorsi F, Salonia A. Anti-Mullerian Hormone-to-Testosterone Ratio is Predictive of Positive Sperm Retrieval in Men with Idiopathic Non-Obstructive Azoospermia. *Sci Rep.* 2017; 15;7(1):17638
7. Ando S, Carpino A, Buffone M, Maggiolini M, Giacchetto C, Seidita. Fructose, prostatic acid phosphatase and zinc levels in the seminal plasma of varicoceles. *Int J Fertil* 1990;35:249-452
8. Andrade-Rocha FT. Significance of sperm characteristics in the evaluation of adolescents, adults and older men with varicocele. *J Postgrad Med* 2007;53:8-13
9. Ardestani Zadeh A, Arab D, Kia NS, Heshmati S, Amirkhalili SN. The role of Vitamin E - Selenium - Folic Acid Supplementation in Improving Sperm Parameters After Varicocelectomy: A Randomized Clinical Trial. *Urol J.* 2019;16(5):495-500
10. Ates E, Ucar M, Keskin MZ, Gokce A. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as a new prognostic predictor after microsurgical subinguinal varicocelectomy. *Andrologia.* 2019 (2):e13188. doi: 10.1111/and.13188. Epub 2018 Nov 5.
11. Ausmees K, Korrovits P, Timberg G, Erm T, Punab M, Mändar R. Semen quality in middle-aged males: associations with prostate-specific antigen and age-related prostate conditions. *Hum Fertil (Camb).* 2014;17(1):60-66
12. Balleca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, Martinez de Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* . 2000; 15: 1734–1738
13. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear ADN fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 2008;90:1716-1722
14. Camejo MI, Abdala L, Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R. Selenium, cooper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 143:1247–1254
15. Carrizo P, Dubin M, Stoppani O . Efectos fisiopatológicos del óxido nítrico y su relación con el estrés oxidativo. *Medicina.* 1998; 58 (4): 367-373  
<http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol58-98/4/efectosfisiopatologicos.htm>
16. Castellón E, Rioseco H, Rojas, Royer M, Salas E, Contreras H, Huidobro C. Glutathione peroxidase activity in cell cultures from different regions of human epididymis. *Asian J Androl* 2005; 7: 33–37
17. Chakraborty J, Sinha H. Jbunjhunwala J. Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of man with varicocele. *J Androl.* 1985;6:117-126
18. Chehval M, Purcell M. Deterioration of some parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril.* 1992;57:174 -177

19. Chen H, Griffiths G, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biol Reprod.* 2006;74:923-930
20. Chiba K, Enatsu N, Fujisawa M. Management of non-obstructive azoospermia. *Reprod Med Biol.* 2016;15(3):165-173. Published 2016 Jan 18. doi:10.1007/s12522-016-0234-z
21. Cho CL, Esteves SC, Agarwal A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl.* 2016;18(2):186-193. doi:10.4103/1008-682X.170441
22. Chung JM, Lee SD. Current Issues in Adolescent Varicocele: Pediatric Urological Perspectives. *World J Mens Health.* 2018;36(2):123-131. doi:10.5534/wjmh.170053
23. Condorelli R, Calogero A, Mongioi L, Vicari E, Russo G, Lanzafame F, La Vignera SJ. Varicocele and concomitant dilation of the periprostatic venous plexus: effects on semen viscosity sperm parameters. *Journal of Endocrinological Investigation.* 2016, 39:543-547. doi: 10.1007/s40618-015-0401-9. Epub 2015 Oct 30.
24. Corral JM, Ballescà JL. Varicocele: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Revisión Rev Iberoam Fert Rep Hum,* 2012; 29:128-153
25. Dadfar M, Ahangarpour A, Habiby A, Khazaely D. Preoperative serum level of inhibin B as a predictor of spermatogenesis improvement after varicocelectomy. *J Urol,* 2010; 10;7(2):110-114
26. Dahl E, Harrick L. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg. Gynecol.Obstret.* 1959;1:697-705
27. Elbardisi H, El Ansari W, Majzoub A, Arafa M. Does varicocelectomy improve semen in men with azoospermia and clinically palpable varicocele? *Andrologia.* 2019 ;e13486. doi: 10.1111/and.13486. [Epub ahead of print].
28. Elzanaty S. Association between age and epididymal and accessory sex gland function and their relation to sperm motility. *Arch Androl* 2007;53:149-56.
29. Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES Jr, Agarwal A Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology.* 2012; 79 (1):16-22.
30. Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinol.* 1998; 139:2128-2136
31. Fujisawa M, Dobashi M, Yamasaki T, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S., Significance of serum inhibin B concentration for evaluating improvement in spermatogenesis after varicocelectomy, *Hum Reprod.* 2001;16(9):1945-1949
32. Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanicsanalysis of the impaired testicular venous drainage system. *Hum. Reprod.* 2005;20:2614-2619
33. Gat Y, Bachar G, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Physical examination may miss the diagnosis of bilateral Varicocele: a comparative study of four diagnostic modalities. *J. Urol.* 2004;172:1414-1417

34. Gdoura, R., Kchaou W, Znazen A, Chakroun N, Fourati M, Ammar-Keskes L, Hammami A. Screening for bacterial pathogens in semen samples from infertile men with and without leukocytospermia. *Andrologia*. 2008;40(4):209-218.
35. Golomb J, Vardinon N, Homonnai Z, Braf Z, Yust I. Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fertil Steril*. 1986 Mar;45(3):397-402
36. Gorelick J, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*. 1993;59:613-616.
37. Goren M, Gat Y. Varicocele is the root cause of BPH: Destruction of the valves in the spermatic veins produces elevated pressure which diverts undiluted testosterone directly from the testes to the prostate. *Andrologia*. 2018
38. Gorur S, Candan Y, Helli A, Akcin S, Cekirge SD, Kaya YS, Cekic C, Kiper AN. Low body mass index might be a predisposing factor for varicocele recurrence: a prospective study. *Andrologia*. 2015;47(4):448-54. doi: 10.1111/and.12287. Epub 2014 May 9.
39. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm ADN damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226-230
40. Gupta N, Sudhakar DVS, Gangwar PK, Sankhwar SN, Gupta NJ, Chakraborty B, Thangaraj K, Gupta G, Rajender S. Mutations in the prostate specific antigen (PSA/KLK3) correlate with male infertility. *Sci Rep*. 2017; 7(1):11225. doi: 10.1038/s41598-017-10866-1.
41. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol*. 2013;10:26-23
42. Han H, Yu ZX, Gong LH, Lu RG2, Li MQ, Fan CZ, Xie DW, Zhou XG1, Zhang XD, Tian L. The Prevalence and Association of Varicoceles on Male Patients With Benign Prostatic Hyperplasia/Lower Urinary Tract Symptoms. *Urology*. 2016;90:97-100
43. Hudson R. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligospermic men with varicoceles. *Fertil Steril*. 1996;66:299-304
44. Hurt G, Howard S, Turner T. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J. Androl*. 1986;7:271-276. En <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.1986.tb00928.x>
45. Huszar G, Ozenci C, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003;79:1616-1624
46. Ishikawa T, Fujisawa M. Varicocele ligation on free testosterone levels in infertile men with varicocele, *Archives of Andrology* 2004; 50:6, 443-448, DOI: 10.1080/01485010490485803
47. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R; Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association Inc. Best practice policies for male infertility. *J Urol*. 2002;167:2138-144

48. Karunasinghe N, Ng L, Wang A, Vaidyanathan V, Zhu S1, Ferguson LR. Selenium Supplementation and Prostate Health in a New Zealand Cohort. *Nutrients*. 2019;12(1). pii: E2. doi: 10.3390/nu12010002.
49. Kathrins M. Historical investigations into varicocele pathophysiology and sperm migration. *Fertil Steril*. 2018;109(1):75-76.
50. Keyhan H, Dadvar A, Ansari M, Rafiee K. Comparison of before and after varicoectomy levels of nitric oxide in seminal fluid of infertile men. *Nephrourol Mon*. 2012;4(4):629-632 doi:10.5812/numonthly.4696
51. Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biol Reprod*. 2009;81:939-947.
52. Kimura M, Nagao K, Tai T, Kobayashi H, Nakajima K. Age is a significant predictor of early and late improvement in semen parameters after microsurgical varicocele repair. *Andrologia*. 2017;49(3). doi: 10.1111/and.12620. Epub 2016 Jun 1.
53. Koksal IT, Ishak Y, Usta M, Danisman A, Guntekin E, Bassorgun IC, Ciftcioglu A. Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier. *Arch Androl* 2007;53:43-48
54. Kondo Y, Ishikawa T, Yamaguchi K, Fujisawa M Predictors of improved seminal characteristics by varicocele repair. *Andrologia*. 2009; 41(1):20-23.
55. Kwon CS, Lee JH. Is semen analysis necessary for varicocele patients in their early 20s?. *World J Mens Health*. 2014;32(1):50-55. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.50
56. Lara-Cerrillo S, Gual-Frau J, Benet J, Abad C, Prats J, Amengual MJ, García-Peiró A. Microsurgical varicoectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters. *Hum Fertil (Camb)*. 2020;9:1-7
57. Leslie SW, Sajjad H, Siref LE. Varicocele. [Updated 2019 Oct 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448113/>
58. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod* 1996;11:2465-2467
59. Libman J, Jarvi K, Lo K, Zini A. Beneficial effect of microsurgical varicoectomy is superior for men with bilateral versus unilateral repair. *J Urol* 2006;176:2602-2605
60. Lome L, Ross L. Varicoectomy and infertility. *Urology*. 1977;9:416-418
61. Lozano-Hernández R , Velasco J, Juárez A, Machado JE. Evaluation of seminal parameters in varicoectomized men treated with *Lepidium meyenii* (Maca). *Acta Bioclin*. 2019;9(17): ISSN: 2244-8136
62. Lozano-Hernández R, Gualdrón J, Camejo MI, Velasco J, Villavicencio A. Markers of accessory glands and seminal parameters in infertile men with overweight and obesity. *Journal of Metabolical Diseases* 2017; 6 (3):2167-0943
63. Lozano-Hernández R, Cardiovascular disease and metabolic syndrome in infertility. *Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome in Infertility*. *Int J Conf Proc*. 1(1):2018b: ICP.000504.

64. Lozano-Hernández R. Male accessory glands and sperm function In Spermatozoa- Facts and Perspectives. In Tech Editors. Croacia. 2018a. 103-116. DOI: 10.5772/intechopen.74321.
65. Lozano-Hernández Ricardo, Saldivia Manuel, Villavicencio Antonio. Concentración espermática mínima requerida para inseminación intrauterina mediante capacitación por migración ascendente. *Revista Obstetricia y Ginecología de Venezuela* 2014; 74(3):177-183
66. Machen GL, Johnson D, Nissen MA, Naber E, Sandlow JI. nTime to improvement of semen parameters after microscopic varicocelectomy: When it occurs and its effects on fertility. *Andrologia*. 2019 Dec 16:e13500. doi: 10.1111/and.13500. [Epub ahead of print]
67. MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* 1965; 16:735.
68. Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil. Steril.* 1995;63:120-124
69. Marks I, McMafion R, Lipshultz L. Predictive parameters of successful varicocele repair. *J. Urol.* 1986;136:609-612
70. Marmar JL. The evolution and refinements of varicocele surgery. *Asian J Androl.* 2016;18(2):171-8. doi: 10.4103/1008-682X.170866. Review. PMID: 26732111 Free PMC Article
71. Martin-Deleon PA. Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. *Int J Androl.* 2011;34:e306-318
72. Masterson JM, Ramasamy R. Case - Azoospermia with bilateral varicocele and normal folliclestimulating hormone. *Can Urol Assoc J.* 2018;12(11):E486-E488. doi:10.5489/cuaj.5298
73. Matkov TG, Zenni M, Sandlow J, Levine LA. Preoperative semen analysis as a predictor of seminal improvement following varicocelectomy. *Fertil Steril.* 2001;75(1):63-68
74. McClure R, Khoo D, Jarvi K. Subclinical varicocele: the effectiveness of varicocelectomy. *J. Urol.* 1991;145:789-791
75. Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril.* 1987;48(6):1006-1011
76. Míguez F, Casal B, García, Dargallo C. Varicoceles in adolescents and relationship with BMI: are varicoceles more frequent in tall thin men?. *Cir Pediatr.* 2019;29;32(3):141-144
77. Moazzam A. Oxidative Stress Induced Infertility in Varicocele. *Andrology (Los Angel)* 5: 156. doi:10.4172/2167-0250.1000156 <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0250.1000156>
78. Mori M, Bertolla R, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents? *Fertil Steril.* 2008;90:1769-1773
79. Nakamura N, Namiki M, Okuyama A. Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril.* 1987;47: 475-480
80. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:473-481
81. Ndovi T, Parsons T, Choi L, Caffo B, Rohde C, Hendrix CW. A new method to estimate quantitatively seminal vesicle and prostate gland contributions to ejaculate. *Br J Clin Pharmacol* 2007;63:404-420



82. Nishiyama M, Danno S, Kaneko, Y. Decreased expression of coM-inhiced RNA- binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Pathol.* 1998;152(1):289-296
83. Oliva A, Multigner L. Chronic epididymitis and Grade III varicocele and their associations with semen characteristics in men consulting for couple infertility. *Asian J Androl.* 2018;20(4):360-365
84. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez M, Sharma R, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas A, Alvarez J. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis of male infertility. *Hum. Reprod.* 2001;16:1912-1921
85. Osuna JA, Lozano JR., Cruz RI, Tortolero, I. Pituitary and testicular function in adolescents whit varicocele. *Arch Androl.* 1999;43(3):183-188
86. Ozturk U, Kefeli M, Asci R, Akpolat I, Buyukalpelli R, Sarikaya S. The effects of experimental left varicocele on the epididymis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008;54(4-5):177-184
87. Pasqualotto F, Lucon A, de Góes P, Sobreiro B, Hallak J, Pasqualotto E, Arap S. Is it worthwhile to operate on subclinical right varicocele in patients with grade II-III varicocele in the left testicle? *J Assist Reprod Genet.* 2005;225:227-231.
88. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73:459-464
89. Peng J, Zhang Z, Cui W, Yuan Y, Song W, Gao B, Xin Z, Zhu S. Spontaneous pregnancy rates in Chinese men undergoing microsurgical subinguinal varicocelectomy and possible preoperative factors affecting the outcomes. *Fertil Steril.* 2015;103(3):635-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.091. Epub 2015 Jan 23.
90. Pham KN, Sandlow JI. The effect of body mass index on the outcomes of varicocelectomy. *J Urol.* 2012 Jan;187(1):219-21
91. Protocolos de la Fundación Puigvert, 2018 BUSCAR REFERENCIA
92. Richardson I, Nagler HM. Is bilateral varicocele more detrimental to male fertility than unilateral varicocele? *Nat Clin Pract Urol* 2007;4:366
93. Roaiah MM, Mostafa T, Salem D, El-Nashar AR, Kamel II, El-Kashlan MS. Alpha-1,4-Glucosidase activity in infertile oligoasthenozoospermic men with and without varicocele. *Andrologia* 2007; 39:28-32
94. Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. *Int Urol Nephrol.* 2018;50(4):583-603. doi: 10.1007/s11255-018-1839-4
95. Rotruck, J.T., A.L. Pope, H.E. Canther. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 1973; 179: 588-590.
96. Ruiz Castañé y cols. Infertilidad masculine. Protocolo de Andrología. Editorial Panamericana. España, 2018.
97. Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, Saâd A. Relationship between semen quality and seminal plasma components: neutral alpha glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia* 2009;41:150-156
98. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear ADN damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 2003;80:1431-1436

99. Schlegel PN, Goldstein M. Alternate indications for varicocele repair: non-obstructive azoospermia, pain, androgen deficiency and progressive testicular dysfunction. *Fertil Steril*. 2011;96(6):1288-93. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.10.033
100. Scholler R, Nahoul K, Castanier M. Testicular secretion of conjugated and unconjugated steroids in normal adults and in patients with Varicocele. Baseline levels and time-course response to HCG administration. *J SteroidBiochem*. 1984;20:203-215
101. Scott L, Young D. Varicocele: a study of its effect on human spermatogenesis and of the results produced by spermatic- vein ligation. *Fertil Steril*. 1962;13:325-334
102. Sevilla y Ruiz A, Moya Gordillo C, Torres Lili G, Canales Perez E. Serum concentrations of estradiol and testosterone in patients with oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia. *Ginecol Obstet Mex*. 1991;59:313-315
103. Shabana W, Teleb M, Dawod T, Elsayed, E, Desoky E, Shahin A. Sorour, W. Predictors of improvement in semen parameters after varicocelectomy for male subfertility: A prospective study. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 2015; 9(9-10), E579–E582. doi:10.5489/cuaj.2808
104. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl*. 2001;22(5):798-803
105. Simbini T, Umapathy E, Jacobus E, Tendaupenyu G, Mbizvo MT. Study on the origin of seminal leucocytes using split ejaculate technique and the effect of leucocytospermia on sperm characteristics. *Urol Int* 1998;61:95-100
106. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE: Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and sterility* 2011, 95(2):652-657
107. Sirvent J, Bernat R, Navarro M. Leydig cell in idiopathic varicocele. *Eur. Urol*. 1990;17:257-261
108. Solis E, Gatti V, Brufman A, Bouvet B, Conforti C, Papparella C, Provenzal O, Balauz N. Inmunología y deterioro de parámetros seminales en varicocele. *Urología Oncológica. Arch. Esp. de Urol*; 2001; 54( 8) 797-800
109. Souza CA, Cunha Filho JS, Santos D, Gratão A, Freitas FM, Passos EP. Predictive factors for motile sperm recovery using testicular biopsy in nonobstructive azoospermic patients. *Int Urol Nephrol*. 2003;35(1):53-57
110. Steckel J, Dicker A, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. *J. Urol*. 1993;149:769-771
111. Taghizadeh L, Eidi A, Mortazavi P, Rohani AH. Effect of selenium on testicular damage induced by varicocele in adult male Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;44:177-185
112. Tinga D, Jager S, Bruijnen C. Factors related to semen improvement and fertility after varicocele operation. *Fertil. Steril*. 1984;41:404-410
113. Turner T, Brown K, Spam C. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity effect of experimental varicocele. *J. Androl*. 1993;14:180-186

114. Turner T, Lopez T. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J. Urol.* 1990;144:1018-1021
115. Turner TI, Riley TA. p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 188-197
116. Vahidi S, Moein M, Nabi A, Narimani N. Effects of microsurgical varicocelectomy on semen analysis and sperm function tests in patients with different grades of varicocele: Role of sperm functional tests in evaluation of treatments outcome. *Andrologia.* 2018;50(8):e13069
117. Vanlangenhove P. Contribution to the Pathophysiology and Treatment of Varicoceles. *J Belg Soc Radiol.* 2018;102(1):22. Published 2018 Feb 9. doi:10.5334/jbr-btr.1453
118. Vivas AG, Lozano JR, Velazco J. Citocinas y función testicular. *Inv Clín.* 2007; 48(1): 107-121
119. Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI. Effect of varicocele grade and age on seminal parameters. *Urol Int.* 2010;85 (2):194-199
120. Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernandez R, Camejo MI. Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Can J Urol.* 2011;18:5884-5889
121. Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Camejo MI. Varicocele decreases epididymal neutral  $\alpha$ -glucosidase and is associated with alteration of nuclear DNA and plasma membrane in spermatozoa. *BJU Int.* 2014;113(4):642-649
122. Vivas-Acevedo, Lozano-Hernández. Relación entre Inmunidad y Fertilidad Masculina. *Tratado de Andrología.* Editorial Panamericana. Apartado 2-Reproducción. N° 37. Código EAN/ISBN 9788498353402. Director [fjortina@Medicapanaamericana.es](mailto:fjortina@Medicapanaamericana.es)  
<http://www.Medicapanaamericana.com> Madrid, 2011
123. Wade M, Foster W, Younglai E, McMahan A, Leingartner K, Yagminas A, Blakey D, Fournier M, Desaulniers D, Hughes C. Toxicol Sci. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. 2002;67:131-143
124. Wang HF, Shi BK, Chu MM, Zhang KQ, Zhu YF, Li YZ, Wang HX. Expression of hypoxia induced factor-1 $\alpha$  and function of epididymis in varicocele: experiment with rats *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88:1670-1672
125. Witt M, Lipsmltz J. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urol.* 1993;42:541-543.
126. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
127. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
128. Yarboroug M, Burns J, Keller F. Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicoceles. *J. Urol.* 1989;141:1372-1374
129. Ye H, Huang G, Gao Y, Liu De Yi. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 2006;21:1545-1550.

130. Yildiz O, Gul H, Ozigok Y, Onguru O, Kilciler M, Aydin A, Isimer A, Harmankaya AC. Increased vasoconstrictor reactivity and decreased endothelial function in high grade varicocele; functional and morphological study. *Urol Res* 2003;31:323-3238
131. Zhang QY, Qiu SD, Ma XN, Yu HM, Wu YW. Effect of experimental varicocele on structure and function of epididymis in adolescent rats. *Asian J Androl* 2003;5:108-112
132. Zhang Y, Ma T, Su Z, Ye M, Tian H, Li J, Liu J. Varicoceles affect semen quality of infertile men in Southern China: A cross-sectional study of 5447 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Aug;96(31):e7707. doi: 10.1097/MD.00000000000007707. PMID: 28767606; PMCID: PMC5626160
133. Zhao YG, Zhou J, Zhang XJ, Men XW, Wang R, Zhou F, Chen DH, Yu ZY, Shi HB. Effects of experimental varicocele on the apoptosis of epididymis epithelium and synthesizing function of the epididymis in rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2006;12(7):619-621
134. Zhou JC, Zheng S, Mo J, Liang X, Xu Y, Zhang H, Gong C, Liu XL, Lei XG. Dietary Selenium Deficiency or Excess Reduces Sperm Quality and Testicular mRNA Abundance of Nuclear Glutathione Peroxidase 4 in Rats. *J Nutr*. 2017;147(10):1947-1953. doi: 10.3945/jn.117.252544. Epub 2017 Aug 16.
135. Zöpfigen A, Priem F, Sudhoff F, Jung K, Lenk S, Loening SA, et al. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, neutral alpha glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod* 2000;15:840-845

# AZOOSPERMIA: CAUSAS Y TRATAMIENTO

Gastón Rey Valzacchi

Médico Especialista en Medicina Reproductiva y Andrología, Director Médico de Procreate, Jefe de la Sección Andrología y Reproducción del Servicio de Urología del Hospital Italiano de Buenos Aires, Profesor Adjunto de Clínica Quirúrgica, Instituto Universitario Hospital Italiano, Ex Presidente de la Sociedad Argentina de Andrología y la Federación Iberoamericana de Sociedades de Andrología.

Autor Corresponsal: Dr. Gastón Rey Valzacchi. Correo electrónico: [gastonrey@procreate.com](mailto:gastonrey@procreate.com)

## Resumen

La azoospermia se define como la falta de espermatozoides en una muestra seminal luego de ser centrifugada y analizada minuciosamente. Existen 3 causas principales de este cuadro, las llamadas pre-testiculares (déficit hipotálamo-hipofisario) que tienen buena opción terapéutica con terapia de sustitución hormonal con gonadotrofinas. Las causas testiculares hoy tienen una posibilidad de recuperar espermatozoides a nivel del testículo que ronda el 50% para poder efectuar una técnica de reproducción asistida.

Las causas pos-testiculares u obstructivas tienen la opción de reconstituir la permeabilidad con técnicas quirúrgicas o la posibilidad también de recuperar espermatozoides para fertilización asistida. Lo importante es realizar un correcto diagnóstico que permitirá un correcto planteo terapéutico. Los tests genéticos desde el cariotipo hasta los actuales paneles genéticos permitirán en un futuro cercano una mejor caracterización del cuadro.

## Introducción

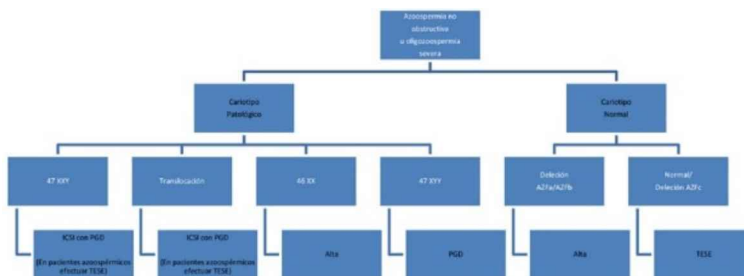
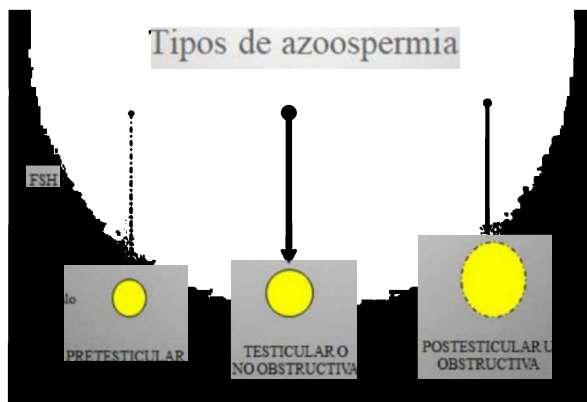
La azoospermia se define como la ausencia de espermatozoides en una muestra de semen centrifugada, en un hombre con función eyaculatoria normal. La incidencia de azoospermia entre los pacientes que consultan por trastornos de fertilidad oscila entre 7 a 20% (1,2). Un tercio de los hombres azoospermicos serán del tipo obstructivo y los restantes no obstructivos (3).

La aparición de las técnicas de reproducción asistida, especialmente de la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) ha permitido para muchos de estos pacientes una posibilidad terapéutica y un enfoque distinto desde el punto de vista diagnóstico.

Antes de catalogar a un hombre como azoospermico debe buscarse intensivamente en el semen la presencia de algún espermatozoide, ya que de ser esta positiva se podrá utilizar para efectuar una ICSI. Para ello se debe centrifugar la muestra durante 15 a 20 minutos a 3000rpm y luego el pellet (sedimento) se analiza bajo microscopio minuciosamente en pequeñas gotitas. Al realizar esto se encuentra en el 15 a 30 % de los pacientes inicialmente catalogados como azoospermicos algún espermatozoide útil para una ICSI (4,5). Este cuadro se denomina criptoazoospermia.

Cuando uno está frente a un cuadro confirmado de azoospermia uno debe plantearse a que se debe este cuadro, pudiendo ser de causa pre-testicular, testicular o pos-testicular. Básicamente para eso utilizamos 2 elementos, el volumen testicular y el nivel de FSH sérica, que en la gran mayoría de los casos nos permite diferenciar el origen. La pre-testicular (hipogonadismo hipogonadotrófico) se caracteriza por presentar muy bajo volumen testicular y muy bajo nivel de

FSH, la testicular por bajo volumen testicular (generalmente mejor que en el pre-testicular) y niveles elevados de FSH y la pos-testicular por volumen testicular normal y FSH normal (**Figura 1**). Esto tiene que ver con que el volumen testicular correlaciona con la funcionalidad de los tubos seminíferos y la FSH es la principal hormona estimuladora de la espermatogénesis, y su nivel responde a la regulación por el *feed back* hipotálamo-hipofiso-testicular.



**Figura 1.** Características de los diferentes tipos de azoospermia (pre-testicular, testicular o pos-testicular) en base al volumen testicular y el nivel de FSH sérico.

### Azoospermia pre-testicular

Esta situación es la que se presenta en el hipogonadismo hipogonadotrófico (HH). Se define al hipogonadismo como hipogonadotrófico cuando cursa con niveles disminuidos de esteroides sexuales y valores de gonadotrofinas normales o bajos, por falla en la secreción episódica o acción de GnRH o por disrupción en la secreción de gonadotrofinas. La presentación clínica del hipogonadismo va a depender del momento en el que aparece y del grado de deficiencia androgénica (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1** - Características clínicas del hipogonadismo pre y postpuberal.

	<b>Inicio pre-puberal</b>	<b>Inicio pos-puberal</b>
Libido y erección	No desarrollada	Disminuida o ausente
Pene	Tipo infantil	Sin cambios
Escroto	Poco pigmentado, ligeramente rugoso	Sin cambios
Testículos	Criptorquidia Menor volumen	Sin cambios o menor volumen

Mama	Ginecomastia	Ginecomastia
Próstata	Pequeña, poco desarrollada	Atrofia
Espermatogénesis	No iniciada Aspermia	Interrumpida, infertilidad Menor volumen de eyaculado
Laringe	Voz infantil	Sin cambios
Piel	Seca y pálida Ausencia de acné puberal	Piel seca, pálida con arrugas Tuforadas
Vello	Vello pubiano con línea horizontal Ausencia de vello facial y corporal	Disminución del vello en axilas, pubis y a nivel corporal Disminución de la frecuencia de afeitado Ausencia de alopecia androgénica
Hueso	Crecimiento huesos largos Retraso en edad ósea, osteoporosis	Osteoporosis Fracturas
Músculo	Poco desarrollo	Atrofia Menor fuerza
Eritropoyesis	Disminuida, anemia	Disminuida, anemia
Lípidos	Aumento de HDL y disminución de LDL	Aumento de HDL y disminución de LDL
Distribución grasa	Ginoide	Cambiando a ginoide

Si el inicio es prepuberal el desarrollo puberal estará incompleto o ausente y los pacientes adquieren hábito eunucoide debido a la falta de cierre en los cartílagos epifisarios de los huesos largos (distancia pubis-pies versus cabeza-pubis es  $>1$ , distancia entre la punta de los dedos medios con los brazos extendidos es mayor a la estatura en 5 cm). El fenotipo es altamente variable según el origen congénito o adquirido del hipogonadismo y el grado de deficiencia androgénica, esto determina que algunos pacientes tienen signos de desarrollo puberal y cierto grado de virilización.

En caso de que el hipogonadismo se inicie luego de la pubertad los principales síntomas son disfunción eréctil, pérdida de libido e infertilidad.

Las causas que determinan la aparición de HH se pueden clasificar en **adquiridas** o **congénitas** (Cuadro 2).

**Cuadro 2** - Causas de hipogonadismo hipogonadotrófico.

ADQUIRIDO	CONGÉNITO

Estructurales	Tumores: craneofaringioma, germinoma, glioma, meningioma, astrocitoma, tumores hipofisarios	Aislado	Síndrome de Kallman
	Enfermedades infiltrativas: tuberculosis, sarcoidosis, hemocromatosis		Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático
	Traumatismos o cirugía		Deficiencia aislada de LH
	Radioterapia		Deficiencia aislada de FSH
	Hipofisitis linfocitaria	Asociado	a obesidad (Síndrome de Prader-Labhart- Willi y Síndrome de Laurence-Moon- Bardet-Biedl)
	Histiocitosis de células de Langerhans		
	Apoplejía hipofisaria.		
Funcionales	Enfermedad aguda, ejercicio físico excesivo, anorexia nerviosa		a hipoplasia suprarrenal congénita (DAX-1)
Fármacos	Opiáceos, anabólicos, corticoides		a otros déficits de hormonas hipofisarias (HESX-1, LHX3, LHX4, PROP1)
Otras	Hiperprolactinemia	Otras	Ataxia cerebelosa familiar

Tanto los prepuberales como los post-puberales tienen 2 momentos en su vida desde el punto de vista terapéutico, cuando desean fertilidad y cuando no lo desean. Entendiendo que el testículo tiene una doble función, la de producir testosterona y espermatozoides, cuando al paciente no le interesa su fertilidad lo que se deberá realizar es una terapia con testosterona para mantener la función que tiene ésta, sin importar que el testículo produzca espermatozoides. Cuando el paciente esté con deseo reproductivo se debe reemplazar la testosterona por las gonadotropinas faltantes (FSH y LH) para inducir la estimulación de la célula de Leydig y por lo tanto la producción de testosterona y la estimulación de los tubos seminíferos para que produzcan espermatozoides.

El tratamiento con gonadotropinas se inicia de 6 a 12 meses antes de que se comience a buscar embarazo. Se indica aplicación de HCG en dos o tres dosis semanales de 1.000 a 1.500 UI por aplicación, la dosis máxima es 5.000 UI/semana. A los 30 a 45 días de iniciado el tratamiento se controla el nivel endógeno de testosterona para poder ajustar la dosis y/o el intervalo de aplicación de la HCG y si se lograron niveles normales de testosterona se agrega gonadotropina menopáusica humana (HMG), FSH purificada o FSH recombinante en dosis de 75 UI intramuscular o subcutánea (dependiendo del tipo de formulación), tres veces por semana, que puede aumentarse a 150 UI por dosis si no se obtuvo espermatogénesis con dosis de 75 UI. El tiempo de respuesta hasta lograr espermatozoides es variable pero puede tardar hasta 2 años.



Algunos autores han descrito la respuesta espermatogénica a la administración de HCG solamente, principalmente en pacientes con déficit adquirido de gonadotrofinas pero en general se necesita administrar ambas gonadotrofinas.

Entre el 40-80% de los pacientes logran respuesta con el tratamiento y se aconseja criopreservar una vez que se obtienen espermatozoides. Una vez que se consigue el embarazo se aconseja continuar con el tratamiento hasta cumplir el primer trimestre. Si no se consiguió respuesta después de 2 años (azoospermia) puede intentarse la biopsia testicular para la extracción de espermatozoides para buscar embarazo mediante un método de fertilidad asistida de alta complejidad (ICSI). El concepto importante a remarcar es que no se debe efectuar un intento de recuperar espermatozoides testiculares en un paciente con hipogonadismo hipogonadotrófico sin estímulo con gonadotrofinas ya que las posibilidades de obtener espermatozoides son nulas (6).

### **Azoospermia secretora o testicular**

La azoospermia de origen testicular se puede deber a alteraciones en la espermatogénesis por causas genéticas (ej: Síndrome de Klinefelter), congénitas (criptorquidia), o adquirida (orquitis, tóxicos, etc).

Clínicamente se caracterizan por tener una hipotrofia testicular y niveles de FSH elevadas. En algunos cuadros como pueden ser las translocaciones o déficit meióticos en donde la espermatogénesis está detenida puede haber volúmenes testiculares normales con niveles de FSH normales.

En los pacientes sin antecedentes que justifiquen el cuadro es importante realizar estudios genéticos, básicamente cariotipo que nos permite diagnosticar cromosopatías como puede ser el síndrome de Klinefelter, o translocaciones y el estudio de la región AZF. Esta región se ubica en el brazo largo del cromosoma Y e involucra la presencia de varios genes relacionados con la espermatogénesis, agrupados en 3 regiones AZFa (proximal), AZFb (central) y AZFc (distal). Lo importante es conocer que en estos pacientes con azoospermia de origen testicular es factible encontrar algunos focos de producción de espermatozoides en aproximadamente el 50% de los casos. En estudios realizados hace muchos años se ha demostrado que en pacientes con obstrucción de la vía espermática o con espermatogénesis normal, el número medio de espermátidas maduras/tubo seminífero se encuentra en un rango entre 17.4 – 31.4 (7). En 1997 Silber presentó la correlación entre los resultados histopatológicos de biopsias testiculares y la posibilidad de recuperar espermatozoides en pacientes con NOA (8). En la gran mayoría de los 45 casos analizados el estudio histológico mostró menos de 4 espermátidas maduras/tubo seminífero, y ningún caso tubo más de 6.5 espermátidas/tubo. Esto representa una reducción entre 6 a 30 veces el número de espermátidas maduras/tubo en relación a los hombres con espermatogénesis normal. Por lo tanto, aparentemente se puede encontrar una muy baja cantidad de espermatozoides en el testículo de los hombres con NOA, y un umbral de 4 a 6 espermátidas maduras/tubo debe ser superado para que algún espermatozoide alcance el eyaculado.

Los trabajos actuales, y nuestra experiencia, demuestra que ni la edad, ni el volumen testicular, ni el nivel de FSH, ni la histopatología testicular son elementos categóricos, por lo que ningún hombre con NOA puede ser excluido de un procedimiento de TESE salvo aquellos con deleción completa de la región AZF a y b (4). Se han propuesto algunos modelos predictivo con análisis multivarial con moderado valor discriminativo entre los pacientes con recuperación positiva y aquellos en los que fue negativo (10).

### **Técnicas de recuperación de espermatozoides**

Inicialmente se describió la técnica de extracción de espermatozoides testiculares (TESE, del inglés *testicular sperm extraction*), que consiste en un procedimiento similar al efectuado para la toma de una biopsia testicular (11). Los trabajos originales describían la toma de múltiples tomas biópsicas (a veces más de 10) hasta encontrar espermatozoides (12). Este procedimiento no está exento de riesgos de atrofia testicular, y por otro lado se ha demostrado que en los hombres con NOA la distribución de la espermatogénesis es homogénea en todo el testículo y no en parches

como se sospechaba y por lo que se efectuaban múltiples biopsias buscando los espermatozoides.

El procedimiento de TESE en pacientes con azoospermia testicular habitualmente consiste en extraer un fragmento de parénquima testicular enviando el material al laboratorio de FIV. Allí el material es disgregado primero mecánicamente, con tijeras y con 2 portaobjetos, y luego puede ser incubado con colagenasa que facilita la búsqueda de espermatozoides (13). Si el laboratorio informa la ausencia de espermatozoides se van efectuando otras tomas (en general hasta 3 de cada testículo). En el laboratorio el material es centrifugado y observado minuciosamente en la búsqueda de espermatozoides. Se considera que ciertas técnicas como los microfluidos o la espectroscopia puede en un futuro identificar mejor la presencia de espermatozoides especialmente aquellos genéticamente normales (14).

Se ha descrito una técnica microquirúrgica (microTESE), por la que se incide la albugínea testicular bajo microscopio para evitar la lesión de los vasos sanguíneos, y bajo una magnificación de 16X – 25X se observan los tubos seminíferos (**Figura 2**). Aquellos tubos con espermatogénesis generalmente se suelen ver de mayor diámetro. Esta aproximación se ha propuesto para extraer una menor cantidad de parénquima testicular y tener una mayor tasa de éxito en la recuperación, sin embargo, un reciente meta-análisis no muestra mejores resultados (15).



**Figura 2.** Micro-TESE. A la izquierda: imagen bajo microscopio quirúrgico observándose dentro del círculo tubos de mayor diámetro. A la derecha: imagen microscópica mostrando la presencia de un tubo con espermatogénesis completa rodeado de tubos vacíos.

Algunos autores aconsejan efectuar una recuperación percutánea (TESA, del inglés testicular sperm aspiration), por ser simple, efectiva y segura (16). Para esto se introduce al testículo una aguja Butterfly Nro 19 o 21, conectada a una jeringa de 20 cc, estando todo el sistema con medio de cultivo. Luego se realizan varios pasajes por el parénquima testicular y se efectúa presión negativa para aspirar el contenido testicular. Si bien es una técnica muy simple, y que permite obtener material (hasta tubos seminíferos), no todos los autores (inclusive nosotros) están de acuerdo en su efectividad. Un trabajo que compara la recuperación con las técnicas a cielo abierto y por punción en los mismos pacientes muestra una tasa de éxito de la primera (TESE) de 43% y de la percutánea (TESA) de 11% (17). Esto sumado al posible riesgo de hematomas nos orientan a efectuar la técnica a cielo abierto.

Asimismo, el material obtenido por TESE suele ser más abundante que por punción, y esto permite la criopreservación del material excedente (18). Para ello se han utilizado distintas técnicas

como la criopreservación de tejido entero en glicerol:TYB, o la criopreservación de espermatozoides en *zonas pellucidas* aisladas (19). Los resultados con material criopreservado suele ser similares a cuando se utilizan espermatozoides frescos (20), sin embargo, este es un tema todavía controvertido y en lo personal los mejores resultados se ven cuando uno criopreserva espermatozoides móviles. Los espermatozoides inmóviles, suelen tener una menor tasa de fertilización, posiblemente pues al descongelarlo no sabemos si está vivo o muerto.

Un tema actual de controversia es el tratamiento medicamentoso previo a la recuperación de espermatozoides. Si bien se considera que la terapia con gonadotrofinas no es útil en pacientes azoospermicos hipergonadotróficos, algunos trabajos han postulado la mejoría en la recuperación de espermatozoides incrementando los niveles de testosterona intratesticular. Para ello se ha postulado el uso de citrato de clomifeno, HCG e inhibidores de la aromatasa (21). Hay algunas evidencias que el mayor beneficio podrían lograrlo aquellos pacientes con una relación estradiol/testosterona mayor a 10 (22).

No cabe dudas que la posibilidad de recuperación de espermatozoides en testículos de hombres azoospermicos, junto con el desarrollo de la técnica de ICSI ha permitido la posibilidad de la paternidad en estos hombres. Los resultados en el uso de estos espermatozoides muestra una tasa de fertilización ligeramente menor que con espermatozoides eyaculados, sin embargo la tasa de embarazo por ciclo es similar, aunque con una tasa de aborto mayor. Actualmente se considera que en estos pacientes la posibilidad de constituir embriones genéticamente alterados, especialmente mosaicismo, es mayor (23). Tal como dijimos previamente, posiblemente los peores resultados se vean al utilizar espermatozoides que fueron criopreservados sin movilidad.

Si bien esto ha permitido una alternativa terapéutica a un número de hombres azoospermicos, existe un 50% de los mismos en los cuales no se logran recuperar espermatozoides a nivel testicular. Para estos se plantean algunas alternativas futuras como son la utilización de células germinales inmaduras, la maduración in vitro de células germinales y el trasplante de espermatogonias.

## **Alternativas futuras**

### *Utilización de células germinales inmaduras*

La aparición de la ICSI ha demostrado que los espermatozoides testiculares son útiles para la fecundación y el logro de nacimientos normales luego de ser inyectado en el citoplasma ovocitario, lo que implica que estos espermatozoides tienen una constitución adecuada para permitir el desarrollo embrionario y que el único evento que ocurre en el espermatozoide luego de su salida del testículo es la adquisición de la capacidad de penetración ovocitaria. Esto ha hecho pensar que sería posible utilizar células germinales inmaduras que tengan un complemento haploide, como son las espermatidas. Pero además de este contenido haploide, la célula capaz de ser utilizada en un proceso de fertilización debe ser capaz de activar al ovocito para que este progrese en su meiosis, y debe aportar el centriolo que dirige las divisiones embrionarias tempranas.

Los trabajos iniciales del grupo de Yanagimachi en roedores permitió demostrar que al inyectar núcleos desnudos de espermatidas redondas en ovocitos que previamente fueron electroactivados se obtiene un 84% de fertilización. Sin embargo, la tasa de implantación fue marcadamente menor que al utilizar espermatozoides testiculares (28 % contra 54%) (24).

Mucho más interesante es el trabajo del mismo grupo que demuestra el logro de animales nacidos luego de la inyección de espermatozoides secundarios los cuales tienen un contenido haploide pero con su ADN duplicado (25). Ellos demuestran que los espermatozoides secundarios se encuentran en el mismo estado meiótico que los ovocitos, y que estos son capaces de inducir la continuación de la meiosis en las células espermáticas.

Si bien todas estas experiencias son muy atractivas para traspasar esto al humano, se debe tener en cuenta la existencia de algunas dificultades. Primeramente, la identificación de estas células inmaduras no es tan fácil de diferenciar in vitro de otras células redondas. En experiencias controladas la exactitud diagnóstica ronda el 80% (27). Segundo, la actividad mitótica normal y el desarrollo de los embriones humanos depende en sus primeras etapas de la actividad del material

centriolar paterno, que es responsable de la migración de los pronúcleos masculinos y femeninos en el momento de la fertilización normal (27). Los espermatoцитos secundarios todavía no han formado este importante material. A diferencia, en los roedores este proceso es guiado por el material centriolar materno. Por último, en todas estas experiencias se ha utilizado células germinales precursoras de animales con espermatogénesis conservada y que no tienen desordenes de la espermatogénesis que ocasionen esterilidad masculina.

En humanos, Tesarik comunicó el uso de espermátidas obtenida del eyaculado de hombres azoospermicos, logrando el nacimiento en 2 de 7 parejas que efectuaron esta técnica (28). Vanderzwalmen comunicó su experiencia en la recuperación y utilización de espermátidas maduras, en elongación y redondas de material testicular, logrando el embarazo a término después de la transferencia de embriones obtenidos de la inyección de espermátidas redondas (29). Sin embargo, en esta transferencia había embriones con espermatozoides de otros orígenes, por lo que no es totalmente claro las posibilidades de desarrollo de los embriones de espermátidas redondas.

Estas comunicaciones, y otras efectuadas a posterioridad ponen de manifiesto algunas dudas y dificultades por lo que el uso de estas células inmaduras todavía deba ser considerada experimental. Primero, la nomenclatura para identificar que es una espermátida inmadura, o un espermatozoide anómalo todavía no es claro. Segundo, como dijimos previamente la identificación de estas células es muy dificultoso. Tercero, la inyección de estas células es muy ineficiente para el logro de embriones. Cuarto, la tasa de implantación de estos embriones es muy baja. Quinto, existen algunas dudas sobre los riesgos genéticos en el uso de estas células, especialmente relacionado con el *imprinting* genómico (30). Y por último, no es claro que exista una real indicación para el uso de estas células, ya que se supone que es sumamente raro la detención de la espermatogénesis en estado de espermátidas.

#### *Maduración in vitro de células germinales*

Se han descrito en mamíferos sistemas de cocultivo de células germinales aisladas y células de Sertoli purificadas, lográndose completar la meiosis y la iniciación de la espermiogénesis (31). La experiencia con espermatogénesis humana es muy limitada (32). La maduración in vitro parecería una posibilidad potencial para el tratamiento de la esterilidad masculina debido a detención espermatogénica.

Tesarik comunicó un estudio piloto utilizando células germinales testiculares de pacientes azoospermicos obstructivos, cultivadas in vitro en la presencia o ausencia de FSH recombinante (33). En la presencia de FSHr se observó la progresión meiótica, y la maduración citoplasmática de las espermátidas. Una experiencia similar fue comunicada por el mismo autor en casos de células germinales de pacientes con déficit en la espermatogénesis.

#### *Transplante de células germinales*

Estudios en modelos animales demuestran que células germinales testiculares pueden ser cultivadas o criopreservadas y luego transplantadas en roedores estériles donde se regenera la espermatogénesis (34). El transplante de células germinales también ha sido efectivo entre diferentes especies de roedores (35).

Técnicamente las células germinales son aisladas usando tratamientos enzimáticos y luego inyectadas directamente en los tubos seminíferos del receptor, en la rete testis o en los tubos eferentes (36). Luego de 2 a 4 ciclos de espermatogénesis (70 a 140 días), los animales son sacrificados, observándose la presencia de células del donante.

Esta es una técnica que podrá ser utilizada en un futuro en humanos para transplante autólogo en pacientes que vayan a efectuar quimioterapia o radioterapia. Otra posible aplicación es combinado con terapia génica para el tratamiento de posibles alteraciones de la espermatogénesis.

### **Azoospermia obstructiva**

La obstrucción de la vía espermática es una entidad importante de ser diagnosticada dada su potencial reversibilidad. Desde un punto de vista práctico, la azoospermia obstructiva puede ser dividida en aquellas que tienen volumen eyaculatorio normal, con bioquímica seminal normal, de aquellas con volumen eyaculatorio bajo, fructosa seminal baja y pH ácido. En las primeras uno pensará en un proceso obstructivo desde el epidídimo hasta la ampolla deferencial, mientras que en la segunda uno deberá pensar en un proceso a nivel de los conductos eyaculadores, ya que la obstrucción en este punto excluye el aporte de las vesículas seminales que normalmente contribuyen con más del 90% del volumen eyaculatorio.

## **Etiología del proceso obstructivo**

### *Infección*

Dependiendo del lugar de localización de la infección, esta se manifestará como una epididimitis, deferentitis, vesiculitis, o prostatitis. Estos distintos procesos en su evolución podrán ir a la cicatrización con compromiso de la permeabilidad de la vía espermática. La localización más frecuente de la obstrucción se encuentra a nivel de la unión epidídimo-deferencial, o a lo largo del epidídimo.

La llegada de gérmenes al tracto genital será a punto de partida frecuentemente uretral, por uretritis gonocócica, a *Chlamydia* o *Mycoplasma*, o por procesos infecciosos del árbol urinario o instrumentaciones uretrales, con la presencia de gérmenes Gram negativos.

La tuberculosis es también una causa de obstrucción de la vía, pudiendo obliterarla en toda su extensión.

### *Traumática*

Raramente la vía puede afectarse por un traumatismo escrotal. En general las causas traumáticas están dadas principalmente por un origen iatrogénico durante la cirugía. De esta manera es factible la obstrucción del epidídimo durante la cirugía de la corrección del hidrocele (al efectuar la resección y eversión de la vaginal), o al explorar el contenido escrotal y lesionar accidentalmente el epidídimo.

Una causa mucho más frecuente es la lesión del conducto deferente durante la hernioplastia, especialmente al efectuarla en niños muy pequeños donde el diámetro y la consistencia del deferente hacen que sea factible su ligadura o devascularización en forma inadvertida (37).

Otra causa posible de obstrucción del deferente es al realizar una deferento-vesiculografía. El traumatismo de la punción y la irritación de los medios de contraste pueden ser la causa de la misma. Se aconseja utilizar catéteres de teflón y medios de contraste hidrofílicos de baja concentración (38).

En general todas estas obstrucciones suelen ser unilaterales y por lo tanto no repercutirán mayormente en la fertilidad. Por esto se considera que la obstrucción por estas causas posiblemente sea mucho mayor de lo que se ve habitualmente.

### *Congénitas y genéticas*

Las obstrucciones congénitas suelen presentarse como agenesias, atresias o hipoplasias de un segmento o de gran parte de la vía espermática. Existen obstrucciones puntuales en algún lugar del epidídimo, o como más frecuentemente la agenesia completa del deferente y el cuerpo y cola epididimaria, existiendo solo un resabio de la cabeza del mismo. Este último cuadro suele ir asociado con alteraciones (hipoplasia o agenesia) de las vesículas seminales por lo que se manifestaran con un volumen eyaculatorio bajo.

En toda agenesia o hipoplasia de vía espermática se debe investigar la estructura de ambos riñones, ya que como se sabe el brote ureteral que durante la vida embrionaria induce la formación de los riñones, tiene origen en el mismo conducto de Wolff del cual deriva la vía espermática.

Hay patologías genéticas como el síndrome de Young y la fibrosis quística que se asocian con obstrucción de la vía. El síndrome de Young se caracteriza por sinusitis crónica, bronquiectasia, y azoospermia obstructiva (39). En la fibrosis quística, la azoospermia obstructiva

es la regla asociándose en general con agenesia deferencial. Además actualmente se considera que algunos procesos obstructivos pueden ser formas menores de enfermedad fibroquística (40).

### *Postvasectomia*

Actualmente la vasectomía es un método muy difundido como método de anticoncepción. Si bien quienes realizan una vasectomía suelen estar seguros de no desear hijos en un futuro, existe un número de pacientes que replantean esa opción. Algunos aspectos técnicos favorecerán la reversión, como ser el efectuar la vasectomía lo más lejos posible del epidídimo dejando los cabos separados de la forma más prolija.

### **Metodología diagnóstica**

El examen físico y el espermograma, nos orientan fuertemente en los procesos pos-testiculares. Así si tenemos un paciente azoospermico, con testículos de buen tamaño, con volumen espermático bajo, pH ácido y fructosa baja, y los deferentes no se palpan, estaremos frente a una agenesia de deferentes y no necesitamos más elementos diagnósticos. Si se da el mismo cuadro, pero se palpan los deferentes, uno deberá solicitar la investigación de espermatozoides en orina post-eyaculado para descartar una retroeyaculación. Si no existen espermatozoides en la orina, se deberá pensar en un proceso obstructivo a nivel de los conductos eyaculadores, diagnostico que lo confirmaremos con una ecografía transrectal de vesículas seminales o una resonancia de pelvis con foco en vesículas seminales y próstata, las cuales nos permitirá ver la dilatación de los conductos eyaculadores y de las vesículas seminales.

Si estamos ante una azoospermia, con testículos normales, y buen volumen eyaculatorio, uno deberá pensar en un proceso obstructivo en epidídimo o deferentes. Para ello la medición de FSH nos orientará a descartar la causa testicular, y procederemos a la biopsia testicular con exploración de la vía espermática. Para ello, bajo anestesia se exterioriza el contenido escrotal, se procede a efectuar la biopsia testicular tal como fuera descripta, y la visualización bajo magnificación del epidídimo. Si este es normal, estaremos posiblemente ante un cuadro testicular (ej. bloqueo espermático), o una obstrucción entre testículo y epidídimo. Si el epidídimo está dilatado buscaremos el punto de obstrucción del mismo; si no se visualiza y por lo tanto todo el epidídimo está dilatado se procederá a efectuar la deferento-vesiculografía (DVG) para descartar una obstrucción deferencial.

Para la misma se disecciona una porción del deferente, preservando la irrigación, se cánula y se inyecta medio de contraste diluido y se visualiza con radioscopia T. Una DVG normal permite la visualización de los deferentes, eyaculadores, vesículas seminales y pasaje del medio de contraste a la vejiga. Si la DVG es normal la obstrucción está en el punto epidídimo-deferencial.

### **Alternativas terapéuticas**

Estos pacientes conceptualmente tienen la opción de revertir la obstrucción o recuperar espermatozoides para efectuar una fertilización asistida. La decisión dependerá de factores como la edad de la mujer y su reserva ovárica, la presencia de otra patología que oriente a realizar una fertilización o el deseo de la pareja.

Las técnicas de desobstrucción se denominan vaso-vasoanastomosis si la obstrucción está en el deferente, vaso-epidídimoanastomosis si está en el epidídimo y si está a nivel de la desembocadura de los eyaculadores es por medio de una resección endoscópica por vía uretral.

### *Vasovasoanastomosis*

Aunque el deferente puede estar obstruido de forma congénita o por lesión en el curso de cirugías inguino-escrotales, traumatismos o procesos inflamatorios, la causa más frecuente está dada por la práctica de una vasectomía. El desarrollo de las técnicas microquirúrgicas ha optimizado los resultados de repermeabilización.

La tasa de permeabilidad post-cirugía es del 85-90% con una tasa de embarazo del 45-60%. La razón para esta discrepancia no se conoce. Posiblemente se deba a afectación de la función

testicular, o del epidídimo y por lo tanto exista una alteración en el proceso de maduración espermática, estenosis parciales de la anastomosis, factores inmunológicos, etc.

Varios elementos pronósticos han sido puestos de manifiestos.

El análisis del tiempo de obstrucción muestra una relación inversa entre éste y el porcentaje de embarazo y recuperación del eyaculado. El peor pronóstico lo constituyen aquellos casos en los que el proceso obstructivo tiene una larga evolución (más de diez años). Se supone que la hiperpresión retrógrada y la dilatación del túbulo epididimario favorecerían la ruptura a éste nivel con el consecuente escape de líquido, formación de un granuloma y creación de una nueva obstrucción a nivel epididimario.

### *Vasoepididimoanastomosis*

En los pacientes con azoospermia obstructiva, la obstrucción a nivel epididimario se presenta en más de los 2/3 de los casos. La microcirugía permite restablecer la continuidad de la vía, practicando una anastomosis directamente entre el tubo epididimario sano pre-obstructivo, donde se hallan espermatozoides, y el conducto deferente en su porción convoluta o recta una vez que se ha comprobado su permeabilidad distal.

La tasa de permeabilidad se encuentra entre el 30 al 50% siendo muy determinante del éxito el nivel de obstrucción del epidídimo, ya que obstrucciones muy proximales al testículo tienen peor pronóstico ya que los espermatozoides no podrán completar el proceso de maduración siendo de escasa movilidad y baja capacidad fecundante.

### *Desobstrucción de los conductos eyaculadores*

En el caso de obstrucción de eyaculadores se sospecha por el espermograma con volumen eyaculatorio bajo y signos ecográficos o de resonancia como la dilatación de las vesículas seminales o la presencia de quistes prostáticos y se confirma con, la deferente-vesiculografía que demuestra la ausencia de pasaje de medio a la vejiga, y el stop en la desembocadura de los eyaculadores. Se procede a la resección de una pequeña porción lateral al verum, pudiendo observarse la salida de fluido espermático. También puede inyectarse colorante por las agujas de la deferente-vesiculografía, que facilita la identificación.

Esta técnica simple permite restablecer la fertilidad luego de un diagnóstico correcto. Si en los estudios espermáticos postoperatorios aumentó el volumen eyaculatorio, pero el paciente se mantiene azoospermico, debe sospecharse un cuadro posible que es la obstrucción secundaria a nivel del epidídimo. Esta obstrucción se debe a que la obstrucción a nivel de los eyaculadores origina un aumento en la presión retrograda con la posible ruptura del tubo epididimario que al cicatrizar origina la obstrucción a este nivel.

### *Aspiración de espermatozoides asociado a ICSI*

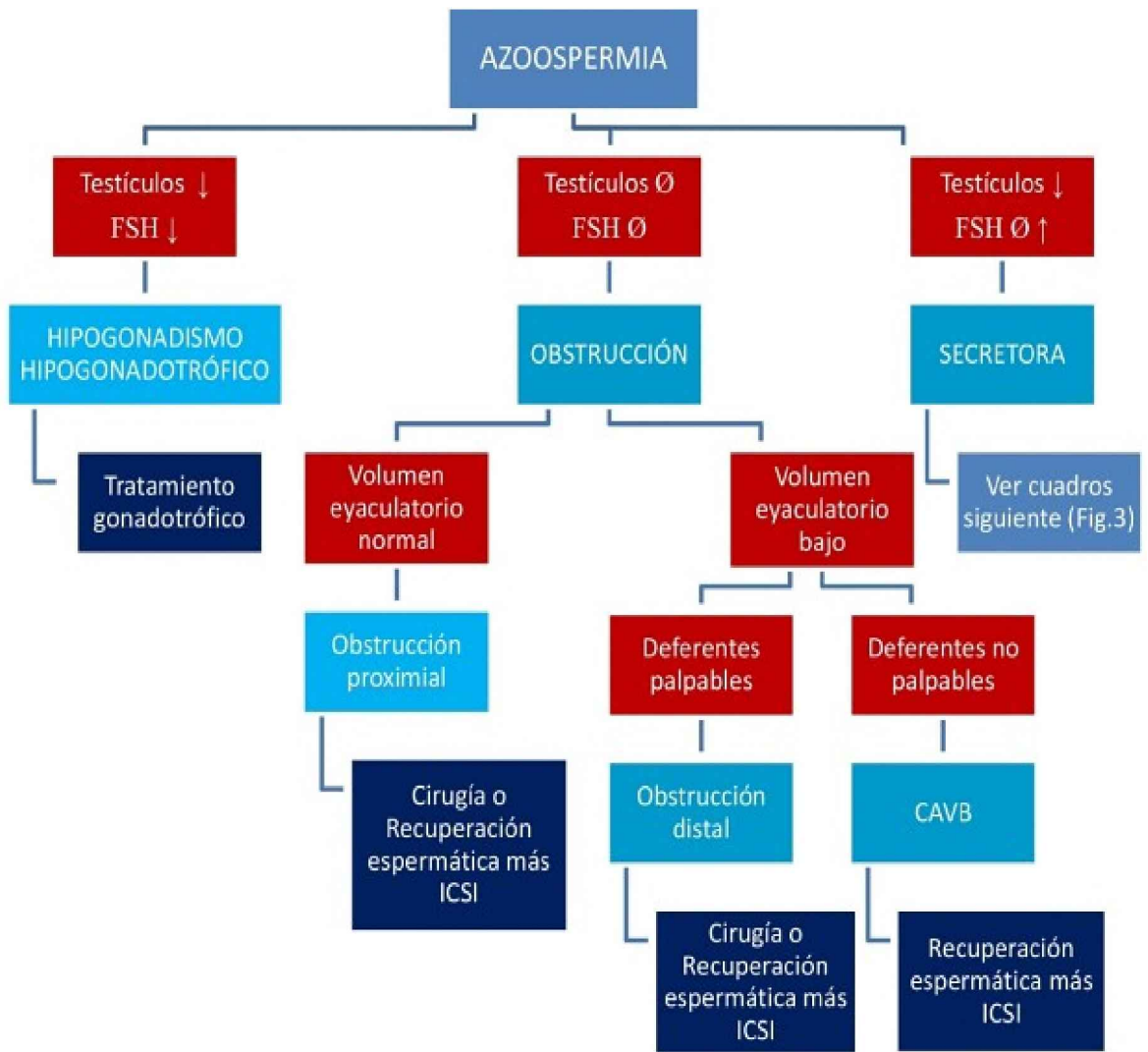
Los pacientes con agenesia de vías espermáticas u obstrucción no corregible microquirúrgicamente constituyen un grupo sin alternativas de tratamiento, en donde generalmente hay una buena producción espermática.

En 1985 Temple-Smith presentó el primer embarazo con espermatozoides obtenidos de epidídimos en un paciente con obstrucción adquirida de la vía espermática asociándolo a FIV (41). En 1987 Silber utilizó la misma técnica en casos de agenesia de la vía logrando embarazo (42).

El desarrollo de la técnica de ICSI ha permitido el tratamiento con una cantidad mucho menor de espermatozoides y con una tasa significativamente mayor de embarazo ya que no se requiere movilidad espermática, ni maduración epididimaria. Esto ha permitido la posibilidad de utilizar espermatozoides recuperados del epidídimo por punción (PESA: aspiración percutánea de epidídimo), o del testículo por punción (TESA: aspiración de espermatozoides testiculares) o a cielo abierto (TESE: extracción de espermatozoides testiculares).

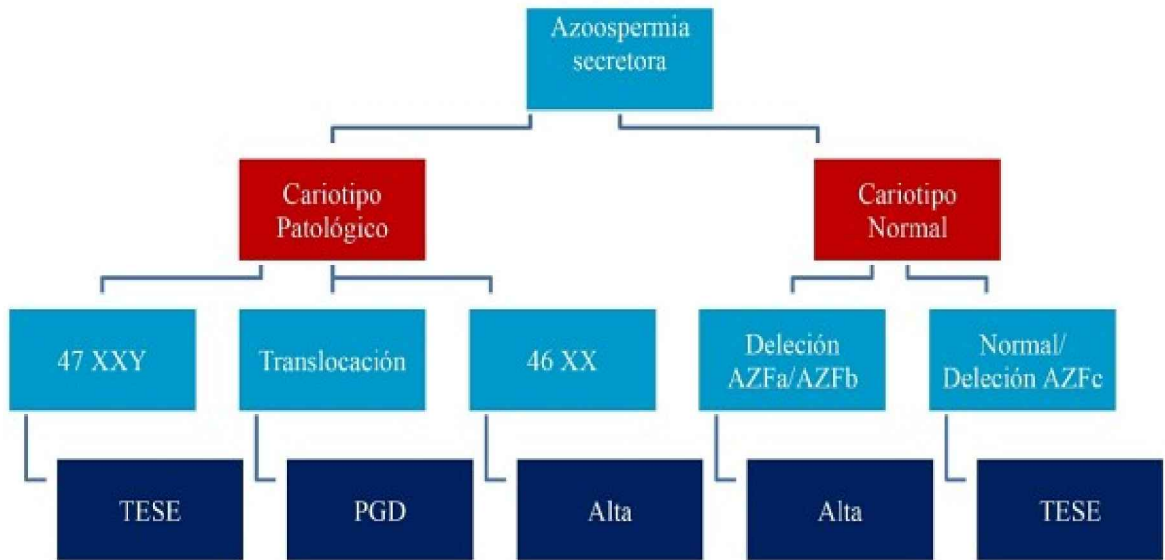
## **Conclusión**

La azoospermia es un cuadro frecuente en la infertilidad masculina. Las técnicas de reproducción asistida, los nuevos tratamientos hormonales y la mejoría de las técnicas microquirúrgicas ha abierto en estos pacientes una importante alternativa terapéutica. En la etapa diagnóstica lo primero es poder identificar si esto se debe a una causa pre-testicular, testicular o pos-testicular para de esta manera poder ofrecer la alternativa terapéutica correspondiente (**Figuras 3 y 4**).



**Figura 3.** Algoritmo de diagnóstico genético en pacientes infértiles azoospermicos. ICSI: inyección espermática intracitoplasmática. PGD: Diagnóstico genético de preimplantación. TESE: extracción de espermatozoides testiculares. Alta: se refiere a la falta de posibilidades terapéuticas actuales con este cuadro.





**Figura 4.** Algoritmo diagnóstico en pacientes con azoospermia. ICSI: inyección espermática intracitoplasmática. CAVD: Agenesia bilateral de la vía espermática.

## Referencias

1. Stanwell Smith RE, Hendry WF: The prognosis of male subfertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic. *Br J Urol* 1984; 56:422-428
2. Comhaire FH, de Kretser D, Farley TM, et al: Towards more objetivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl suppl* 1987; 7: 1 - 53
3. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI: Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;142: 62 - 65
4. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, el al: Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12:1226
5. Casemiro Monteiro RM, Risso Pariz J, de Campos Pieri P et al. An easy, reproducible and cost-effective method for andrologists to improve the laboratory diagnosis of non-obstructive azoospermia: a novel microcentrifugation technique. *Int Braz J Urol.* 2016; 42: 132-8
6. Fahmy I, Kamal A, Shamloul R et al. CSI using testicular sperm in male hypogonadotrophic hypogonadism unresponsive to gonadotrophin therapy. *Hum Rep* 2004; 19 1558-1561
7. Silber SJ, Rodriguez-Rigau LJ: Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertili Steril* 1981;36:480-485
8. Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, et al: Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 1997;12: 2422 - 2428

9. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P: Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80 – 86
10. Cissen M, Meijerink AM, D'Hauwers KW et al. Prediction model for obtaining spermatozoa with testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2016; 31:1934-41
11. Devroey P, Liu J, Nagy Z et al: Pregnancy after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10: 1457 – 1460
12. Silber SJ, Liu J, Van Stertieghem AC, et al: Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril* 1996; 66:110 – 117
13. Crabbé E, Verheyen G, Tournaye H, et al: The use of enzymatic procedures to recover testicular germ cells. *Hum Reprod* 1997; 12: 1682 – 1687
14. Samuel R, Badamjav O, Murphy K. Microfluidics: The future of microdissection TESE?. *Syst Biol Reprod Med* 2016; 62: 161–170
15. Corona G, Minhas S, Giwercman A, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019; 25:733-757
16. Craft I, Tsirigotis M: Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1995; 10: 1623 – 1626
17. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, et al: Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1488 – 1493
18. Oates R, Mulhall J, Burgess C, et al: Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 734 – 739
19. Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, et al: Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 994 – 1001
20. Ohlander S, Hotaling J, Kirshenbaum E et al. Impact of fresh versus cryopreserved testicular sperm upon intracytoplasmic sperm injection pregnancy outcomes in men with azoospermia due to spermatogenic dysfunction: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2014;101:344-9
21. Shiraishi K. Hormonal therapy for non-obstructive azoospermia: basic and clinical perspectives. *Reprod Med Biol* 2015 ;14:65–72
22. Reifsnyder JE, Ramasamy R, Hussein J, Schlegel PN. Role of optimizing testosterone before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2012;188:532–6.
23. Silber S, Escudero T, Lenahan K. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 79:30–8.
24. Kimura Y, Yanagimachi R: Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995;121: 2397 -405
25. Kimura Y, Yanagimachi R: Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995; 53:855-862

26. Angelopoulos T, Krey L, McCullough A, et al: A simple and objective approach to identifying human round spermatids. *Hum Reprod* 1997; 12: 2208 - 2216
27. Borners M, Bailly E, Gosti F, et al: The centrosome; recent advances on structure and functions. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 1990; 11: 86 - 114.
28. Tesarik J, Mendoza C, Testart J: Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995; 333:525
29. Vanderzwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, et al: Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1203 -1213
30. Tycko B, Trasler J, Bestor T: Genomic imprinting: gametic mechanism and somatic consequences. *J Androl* 1997; 18: 480-486
31. Kierszenbaum AL: Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 1994; 15: 116 - 134
32. Tres LL, Mesrobian HG, Abdullah M, et al: Human Sertoli-spermatogenic cell cocultures prepared from biopsies of cryptorchid testes performed during orchidopexy. *J Urol* 1989; 141: 1003 - 1009
33. Tesarik J, Greco E, Rienzi L, et al: Differentiation of spermatogenic cells during in vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia. Effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 2722 - 2781
34. Brinster RL, Zimmermann JW: Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298 - 11302
35. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, et al: Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 1996; 381: 418 - 421
36. Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, et al: Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 111 - 122
37. Schoysman R: Epididymal causes of male infertility: pathogenesis and management, *Int J Androl (suppl)* 1982; 5:120-134
38. Wagenknecht LV: Obstruction in the male reproductive tract. In: *Treatment of male infertility*. Ed Bain J, Schill WB, Schwarztein L. Springer-Verlag, Berlin, 1982
39. Hugues TM, Skolnick JL, Belker AM: Young's syndrome: an often unrecognized correctable cause of obstructive azoospermia, *J Urol* 1987; 137:1238
40. Anguiano A, Oates RD, Amos JA y col: Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 1992; 267:1794-1797
41. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CAS, y col: Human pregnancy by in vitro fertilization(IVF) using sperm aspiration from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1985; 2:119-122
42. Silber SJ, Ord T, Borrego C, y col: New treatment for infertility due to congenital absence of the vas deferens. *Lancet* 1987; 10 :850-851

# PERSPECTIVA ACTUAL DEL USO CLÍNICO DE LOS ANTIOXIDANTES PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

B. José Manuel Mayorga-Torres<sup>1</sup>

Meritxell Jodar<sup>1,2</sup>

Marina Leiva<sup>1</sup>

Dolors Manau<sup>3</sup>

Antonio Alcaraz Asencio<sup>4</sup>

Rafael Oliva<sup>1,2</sup>

Ferran García<sup>6</sup>

Juan Manuel Corral<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Biología Molecular y del Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer. Unidad de Genética. Departamento de Biomedicina. Universidad de Barcelona. <sup>2</sup>Sección de Bioquímica y Genética Molecular. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic de Barcelona. <sup>3</sup>Unidad de Reproducción Asistida. Servicio de Ginecología. Hospital Clínic de Barcelona. <sup>4</sup>Unidad de Uroandrogología. Unidad Urooncología. Hospital Clínic de Barcelona <sup>5</sup> en representación de la Sección de Andrología de la Societat Catalana d'Urologia. <sup>6</sup>Presidente de la Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA).

Autor Corresponsal: Dr. Juan Manuel Corral. Correo electrónico: [JMCORRAL@clinic.cat](mailto:JMCORRAL@clinic.cat)

## Cápsula

En este capítulo analizamos el estado actual de las metodologías disponibles para evaluar el estrés oxidativo, así como el impacto de diferentes tratamientos antioxidantes sobre la fertilidad masculina.

## Introducción

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja para concebir después de al menos un año de relaciones sexuales sin protección (1). Esta condición afecta a un número cercano a 186 millones de personas en todo el mundo, de los cuales el factor masculino se encuentra implicado en el 50% de los casos (2,3). Estudios recientes sugieren una disminución general en las tasas globales de fertilidad de 4,7 a 2,4 nacidos vivos entre 1950 y 2017 (3). Además, diferentes estudios focalizados en la fertilidad masculina muestran una tendencia negativa de la calidad espermática en los últimos 30 años (4–7). Si bien algunos factores sociodemográficos como tener hijos a una edad más avanzada pueden explicar la disminución de las tasas globales de fertilidad, existe cada

vez más evidencias que sugieren que los factores ambientales y los hábitos de vida poco saludables contribuyen considerablemente a una peor calidad seminal (7–10).

Dentro de las posibles causas de infertilidad masculina se incluyen una amplia variedad de alteraciones como por ejemplo, defectos anatómicos como el varicocele, obstrucciones y fallos de eyaculación, infecciones del tracto genital, trastornos genéticos, alteraciones endocrinas y problemas inmunológicos, entre otros (7). Además, se ha demostrado que factores como el estilo de vida, el medio ambiente y algunos hábitos tóxicos pueden también afectar la calidad y el desarrollo de los gametos y embriones (8–10). Actualmente, se está investigando en profundidad el impacto que puede tener el estrés oxidativo y la capacidad celular antioxidante en la fertilidad masculina, en especial el impacto de éstos sobre la calidad seminal (11). Diferentes estudios sugieren que entre el 30 y 80% de los pacientes infértiles presentan unos niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (EROS) en el semen (11). Aunque se conoce que unos niveles fisiológicos de EROS son necesarios para el buen funcionamiento del espermatozoide, ya sea o bien contribuyendo a la movilidad del espermatozoide o bien promoviendo procesos como la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica, la fusión al oocito y la fertilización, se ha observado que un desequilibrio entre la producción de EROS y la capacidad celular antioxidante tiene un impacto negativo en la fertilidad masculina (Figura 1). Por ejemplo, los niveles altos de estrés oxidativo en el semen se han asociado con una menor concentración y motilidad de los espermatozoides, así como a una menor integridad del acrosoma y a un mayor daño del ADN de los espermatozoides (12–15). Además, se ha observado una correlación negativa entre unos niveles elevados de EROS en el semen y la capacidad de fertilización del espermatozoide, así como en la calidad del embrión después de los ciclos de fecundación *in vitro* (FIV) (14,16,17).

En base a todo el conocimiento actual sobre el impacto negativo del estrés oxidativo en la fertilidad masculina, el tratamiento de pacientes infértiles con antioxidantes orales ha ganado relevancia dentro de las prácticas clínicas rutinarias de evaluación del varón infértil (11). Diferentes estudios han demostrado el efecto beneficioso del consumo de antioxidantes frente al daño oxidativo provocado por componentes ambientales y patológicos, mejorando así las características espermáticas, principalmente aquellas asociadas al análisis del seminograma y a las tasas de fertilidad. Recientemente, ha habido una serie de avances tecnológicos que pueden ser de gran utilidad para la evaluación de la infertilidad masculina, lo que refleja la necesidad de una actualización de las directrices del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la infertilidad masculina (18). No obstante, a día de hoy la Asociación Europea de Urología en las guías clínicas sobre la Salud Sexual y Reproductiva Masculina de 2021 no apoya el uso generalizado de los tratamientos antioxidantes en la práctica clínica del hombre infértil (6). Principalmente, esto se debe a que, a día de hoy, aún no hay un método estandarizado para la medición de las EROS en el semen, así como, al gran sesgo observado entre los estudios empíricos que analizan el impacto de diferentes tratamientos con antioxidantes en la tasa de embarazo (12). Además, tampoco hay un consenso de los constituyentes o principios activos de los antioxidantes óptimos, ni tampoco del tiempo que éstos deben ser administrados. Esto nos indica la necesidad de nuevos estudios basados en ensayos clínicos prospectivos, de doble ciego, aleatorizados, y controlados con placebo que validen la utilidad clínica tanto de las metodologías para determinar las EROS seminales, así como validar la efectividad de diferentes compuestos antioxidantes (solos o formulados) en el tratamiento de la infertilidad masculina.

En este capítulo de libro, analizamos el estado actual de las metodologías disponibles para la medida del estrés oxidativo, así como el impacto de los diferentes tratamientos con antioxidantes sobre la calidad espermática y la fertilidad masculina.

## **Estrés oxidativo y la infertilidad masculina**

El estrés oxidativo (EO) se origina a partir del desequilibrio entre los niveles de los compuestos antioxidantes y prooxidantes. Este desequilibrio es producto del aumento de las EROS y/o a la deficiencia de la capacidad antioxidante celular (Figura 1) (13).

Las EROS y/o “radicales libres” son moléculas derivadas del oxígeno, altamente reactivas, que se caracterizan por tener electrones no apareados en su orbital externo. Incluyen radicales centrados en el átomo del oxígeno (radical hidroxilo, radical óxido nítrico y radical anión superóxido) y derivados no radicales (peróxido de hidrógeno, anión peroxinitrito y ácido hipocloroso). Estas moléculas son generadas en el organismo en respuesta a señales fisiológicas, actúan como moléculas de señalización de vida corta y están implicadas en procesos como la división celular, la inflamación, la función inmunológica, la autofagia y la respuesta al estrés (14).

No obstante, la producción incontrolada de EROS induce al estrés oxidativo, alterando las funciones celulares y contribuyendo a desarrollo de múltiples patologías como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, el cáncer y la infertilidad (8).

En el semen existen numerosas y diversas fuentes de EROS tanto endógenas como exógenas que pueden alterar el equilibrio entre los compuestos antioxidantes y pro-oxidantes y así afectar la homeostasis celular y como consecuencia alterar la calidad espermática (13,15,16). En el eyaculado, las principales fuentes endógenas de EROS son las células espermáticas y los leucocitos seminales (17,18). Los espermatozoides generan EROS de forma fisiológica durante su metabolismo celular, principalmente en las mitocondrias. Las mitocondrias son la principal fuente energética de los espermatozoides humanos y las principales contribuyentes del superóxido intracelular, el cual es generado de forma mayoritaria durante la fosforilación oxidativa mitocondrial (15,19). Alteraciones en diversas proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa mitocondrial están también presentes en los espermatozoides de pacientes que presentan fallos de fertilización tras tratamiento de reproducción asistida (20). Además, se ha descrito que células espermáticas inmaduras y anormales generan una mayor cantidad de EROS intracelular debido a la acción de la enzima citoplasmática glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa presente en los residuos citoplasmáticos de estas células (21). Las otras células que pueden actuar como fuente endógena de EROS en el semen son los leucocitos. Aunque los leucocitos suelen ser escasos en el líquido seminal, durante un proceso infeccioso en el tracto urogenital masculino, éstos pueden ser reclutados con el objetivo de eliminar microorganismos patógenos y pueden encontrarse en una concentración anormalmente elevada en el semen, lo que se conoce como leucocitospermia. Los leucocitos y en especial los activados, son capaces de producir por lo menos 1.000 veces más cantidad de EROS (superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso) que las células espermáticas maduras, generando un aumento desproporcionado de las concentraciones de EROS en el semen, que pueden causar un empeoramiento de la calidad seminal (22). Además, existen componentes exógenos asociados a la exposición y metabolización de compuestos nocivos que también contribuyen al aumento de las EROS en el eyaculado como el humo del tabaco, los ácidos grasos de los alimentos, los metales de transición y el etanol, entre otros (10,23,24). Algunos agentes físicos también pueden inducir la producción de las EROS como por ejemplo, los rayos gamma, los rayos X y la irradiación ultravioleta (13,25).

Para contrarrestar los efectos de estos EROS, en el eyaculado encontramos antioxidantes que interactúan positivamente entre sí para mantener un equilibrio redox que permita conservar un balance celular funcional. Es durante este proceso que los sistemas de detoxificación cobran relevancia. Los antioxidantes se definen como un grupo de compuestos químicos que retrasan, controlan y/o previenen procesos oxidativos, reduciendo el daño causado por las EROS y son uno de los principales mecanismos que utiliza el cuerpo para mantener un balance reducción-oxidación (redox) (26). Los antioxidantes que encajan dentro de esta definición incluyen, por ejemplo, a captadores de radicales libres, desactivadores del oxígeno singlete, inactivadores de peróxidos y otras EROS, quelantes de iones metálicos, desactivadores de productos de oxidación secundaria y inhibidores de enzimas pro-oxidativas (27). Los antioxidantes pueden clasificarse de múltiples formas. En primer lugar, están los que son producidos por el propio cuerpo, es decir, antioxidantes endógenos y los que se derivan de fuentes externas, antioxidantes exógenos. Dentro de los antioxidantes enzimáticos encontramos la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH) (28). Estas tres enzimas están presentes tanto en el espacio intracelular como en el extracelular del espermatozoide y forman el principal sistema antioxidante del semen (29). La SOD cataliza la eliminación del anión superóxido, y en el semen encontramos específicamente dos isoformas: la SOD-1 y la SOD-3 (30). La actividad de la SOD seminal ha sido correlacionada positivamente con la concentración y motilidad de los espermatozoides (32). Por otro lado, la catalasa actúa directamente sobre el peróxido de hidrógeno, lo que resulta en su descomposición en agua y oxígeno molecular. Un estudio piloto encontró una correlación positiva entre los niveles de catalasa en semen y la motilidad progresiva de los espermatozoides en individuos normozoospermicos (33). Finalmente, la GPX es la enzima responsable de la reducción catalítica del peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos, incluidos los peróxidos de los fosfolípidos. De forma interesante, se ha identificado una isoforma específica de GPX en semen que protege el ADN espermático del daño oxidativo y promueve a la correcta descondensación de la cromatina después de la fertilización (34–36). A parte de antioxidantes enzimáticos, en el semen también se encuentran en concentraciones bajas una gran variedad de antioxidantes no enzimáticos, que incluyen las vitaminas A, E, C, el complejo B, el glutatión (GSH), la coenzima Q10, la carnitina y microelementos como zinc, cobre, selenio y cromo (29).

Los espermatozoides son más susceptibles a EO en comparación a otras células debido a que poseen una gran cantidad de mitocondrias, tienen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en su membrana celular, lo cual los hace altamente susceptibles al ataque de radicales libres, y además, al ser células inertes a nivel transcripcional y traduccional poseen una limitada capacidad para protegerse del EO (37). La peroxidación lipídica es el principal mecanismo por el cual el EO induce alteraciones funcionales en los espermatozoides y está relacionado principalmente con la capacidad de estos metabolitos altamente reactivos para estimular una reacción en cadena (8). Específicamente, los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en altas concentraciones en las membranas de las células espermáticas facilitan el proceso de abstracción de hidrógeno que inicia la cascada de peroxidación (17). Este fenómeno genera la propagación de la reacción en cadena induciendo un daño oxidativo sobre diferentes biomoléculas como las proteínas, lípidos, y el material genético del espermatozoide, promoviendo finalmente la oxidación del ADN y la fragmentación de éste (8).

Un gran número de estudios han demostrado la importancia del EO como uno de los principales factores que pueden explicar la etiología de las alteraciones funcionales de los espermatozoides (8,15,16,19,38,39). A día de hoy, se ha estimado que entre un 30-80% de los hombres infértiles tienen niveles elevados de ROS seminales, lo que aumentaría el daño del ADN espermático y reduciría las posibilidades de fertilización y/o desarrollo de embriones sanos (40). Por tanto, la utilidad diagnóstica y pronóstica de los índices de EO cobra relevancia en el tratamiento y seguimiento del hombre infértil, aportando información relevante sobre el potencial reproductivo.

### **Metodologías usadas para el estudio del estrés oxidativo seminal**

El análisis de biomarcadores asociados al EO cobra importancia en el estudio de las posibles causas de la infertilidad masculina. Las estrategias que se usan de forma rutinaria en el estudio del EO se basan en la detección y cuantificación directa de las EROS o bien la detección y cuantificación indirecta de la oxidación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (41).

Las EROS son moléculas de vida media corta y por tanto las convierte en excelentes moléculas de señalización, pero su medición en los sistemas biológicos es compleja y requiere de estrategias y/o equipamiento sofisticados (42). En la tabla 1 y figura 2 se resume las pruebas que actualmente se usan para detectar marcadores de EO en el estudio de la infertilidad masculina.

La aproximación más usada en la clínica y la cuál está sugerida en el manual de laboratorio de la OMS para el examen del EO del semen humano es la detección directa de los EROS extracelulares mediante quimioluminiscencia usando compuestos como el luminol o la lucigenina (43). Estos compuestos son sondas que al ser oxidadas emiten una señal de quimioluminiscencia cuantificable y que se correlaciona con la cantidad de  $O^{\cdot-2}$  presente en el eyaculado o en plasma seminal (43). Estos ensayos pueden ser utilizados con fines de diagnóstico, debido a su fácil y rápido procesamiento, lo que facilita su implementación en la clínica (44). A día de hoy, existen numerosos estudios que sugieren una asociación negativa entre el aumento de los niveles de EROS detectados por luminometría y los parámetros de calidad espermática como el recuento, la motilidad, la viabilidad y la morfología de los espermatozoides (45,46). Sin embargo, se ha puesto en duda la validez del uso de estas metodologías debido a la posibilidad de que estas sondas promuevan por sí mismas, la generación de EROS y por tanto haya una sobreestimación de los niveles de EROS (47). Por esta razón, para que esta metodología pueda ser usada con fines clínicos se deben implementar controles para corroborar la validez del resultado obtenido. Además, cabe destacar que estas pruebas no permiten cuantificar la presencia de EROS intracelulares de los espermatozoides y de las células contaminantes, ya que únicamente identifican las EROS que se encuentran en el medio extracelular. Existen otras pruebas colorimétricas usadas para detectar EROS extracelulares (principalmente  $O^{\cdot-2}$ ) en el eyaculado como son la prueba reducción del citocromo c y el ensayo de azul de nitro-tetrazolio (NBT). Estas técnicas consisten en medir mediante espectrometría el producto de la reducción/oxidación de la sonda: ferrocitocromo c y formazan, respectivamente (48). Algunos

estudios han correlacionado la producción de EROS seminales utilizando el ensayo NBT con marcadores de la calidad espermática como la fragmentación del ADN y la motilidad de los espermatozoides (49).

Además de la detección de los EROS extracelulares, diferentes tipos de sondas fluorescentes han sido diseñadas y empleadas para la cuantificación de EROS intracelulares. El análisis consiste en cuantificar la señal de fluorescencia del producto de la oxidación de la sonda, al ser ésta excitada por una fuente externa. Existen una amplia variedad de sondas empleadas para cuantificar los distintos tipos de EROS. Por ejemplo, la sonda dihidroetidio (DHE) y su análogo modificado llamado mitoSOX permiten la detección del anión superóxido dentro de las células y las mitocondrias, respectivamente (50,51). Para la cuantificación del  $H_2O_2$  intracelular se han usado sondas como por ejemplo: DCFH-DA, Amplex Red y la escopoletina, cada una de ellas con un perfil de detección y especificidad diferente para las EROS (48). Se ha visto que las muestras de semen de parejas infértiles de origen desconocido presentan niveles altos de EROS intracelular y fragmentación del ADN y, por tanto, estos parámetros cobran relevancia en el estudio de la infertilidad masculina (52,53). Otras sondas más específicas, como la sonda fluorescente DHR ha sido utilizada para la detección de peroxinitritos (ONOO-) intracelulares aportando información sobre procesos celulares importantes como la capacitación espermática y la reacción acrosomal (54,55).

En las últimas décadas, se ha utilizado el estudio directo del estado redox celular para describir los fenómenos oxidación y reducción en los sistemas biológicos. El análisis del potencial redox de un compartimento o de célula específica se puede realizar utilizando una variedad de técnicas. Para ello, existen varios métodos para el seguimiento de los cambios del estado redox en las células, y estos incluyen la medición de las concentraciones intracelulares de glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG, respectivamente), la medición de las concentraciones intracelulares de NAD(P) + y NAD(P)H, la medición de tioles proteicos cuyas reacciones impulsan el sistema redox celular y constituyen un grupo redox activo más grande, o la medición de la capacidad antioxidante celular entre otros (48). Recientemente, se ha desarrollado un sistema galvanostático (Mioxys) utilizado para medir la transferencia de electrones entre los compuestos reductores y los compuestos oxidantes. Esta medición nos indica el potencial de oxidación-reducción (ORP) de una muestra y es un método de detección directa del estrés oxidativo o del desequilibrio redox en muestras biológicas. Este análisis sirve como indicador del potencial EO y se ha demostrado que el ORP se correlaciona con varias condiciones patológicas asociadas al EO (56). Actualmente, el sistema Mioxys puede medir el ORP de forma rápida y sensible y puede proporcionar una alternativa para medir de forma sencilla el EO de las muestras de semen (56). En un estudio comparativo entre hombres con parámetros seminales normales y alterados se determinó que el valor ORP tiene un valor predictivo para la distinción entre los dos grupos (57).

Como alternativa a la detección directa de los EROS, se han diseñado diferentes estrategias para determinar la oxidación de biomoléculas como los lípidos, proteínas y ADN, las cuales pueden correlacionarse de forma indirecta al EO de nuestro sistema biológico. Dentro de los métodos más utilizados para evaluar indirectamente el EO, encontramos la determinación de la peroxidación lipídica (48). La evaluación de la peroxidación lipídica se basa en la medición de los productos finales de las reacciones de oxidación de los lípidos de las membranas celulares, que son los aldehídos libres generados, incluidos los malondialdehídos (MDA), el 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE), los isoprostanos (IsoP) y la acroleína (58). Varios estudios han demostrado que niveles altos de peroxidación lipídica se asocian con una mala calidad espermática (42). Estas pruebas son utilizadas convencionalmente como marcadores del EO y ciertos estudios sugieren que éstos podrían predecir los resultados de las técnicas de reproducción asistida (ART) (59).

También podemos medir la oxidación inducida en las proteínas por las EROS generando alteraciones estructurales, en la actividad enzimática o en las modificaciones post-traduccionales, de forma reversible o irreversible (58). Por tanto, la detección de estas oxidaciones puede darnos de forma indirecta el grado de EO de una muestra. El ensayo de carbonilo es la estrategia más utilizada para medir la oxidación proteica y se basa en la medición de los grupos carbonilo de las proteínas los cuales son producto de la oxidación directa de aminoácidos por las EROS. Se ha demostrado que los grupos carbonilos de las proteínas son relativamente estables y representan



una modificación irreversible (58). Este biomarcador es considerado como un indicador de la oxidación global de las proteínas para el cual se han diseñado varios métodos de detección incluidos ensayos espectrofotométricos, ensayos ELISA, detección de fluorescencia y Western blot (60). También se utiliza la medición de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) que son el resultado de modificaciones entre los grupos amino de las proteínas y los azúcares reductores. Aunque la formación de AGE no depende completamente del EO, pueden usarse como posibles biomarcadores que pueden aumentar o disminuir dependiendo de una mayor producción de EROS o de la activación de los enzimas antioxidantes. Diferentes estudios reportan la relación entre los AGE y la infertilidad masculina (61–63).

Finalmente, se conoce que las EROS causan gran variedad de lesiones en el ADN como alteraciones de bases y/o azúcares, ciclación de azúcar-base, enlaces cruzados entre ADN-proteína y enlaces cruzados entre cadenas, que a su vez pueden resultar en roturas estructurales del ADN. El daño oxidativo del ADN puede causar sustitución, adición, deleción y otras alteraciones sobre las bases nitrogenadas. La 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) es una de las principales modificaciones oxidativas en el ADN que se generan por hidroxilación de los residuos de desoxiguanosina. La detección y cuantificación de la 8-OHdG ha sido usada como un indicador temprano del daño al ADN. Algunos estudios han reportado una correlación negativa entre los niveles de 8-OHdG con la fertilidad masculina (64–66) y la calidad del espermática (67). Debido a que estas lesiones oxidativas del ADN no pueden ser reparadas por los espermatozoides maduros, ya que son transcripcionalmente y traduccionalmente inactivos, se puede desencadenar la fragmentación del ADN. No obstante, la oxidación de ADN espermático no siempre va ligada a la fragmentación del ADN ya que, aunque en algunos casos la fragmentación del ADN de los espermatozoides puede ser una consecuencia de una oxidación intensa del material genético, la oxidación moderada del ADN espermático con frecuencia no se asocia con la fragmentación de éste (68). Además, aunque un gran número de estudios han concluido que el EO es uno de los factores más comunes asociados con la fragmentación del ADN espermático (SDF) (69–71), existen otros muchos factores involucrados en la fragmentación del ADN nuclear de los espermatozoides como por ejemplo, la remodelación incorrecta de la cromatina, la actividad nucleasa o la exposición a factores externos como la radiación, o compuestos tóxicos (71–78). De todos modos, en los últimos años, SDF se ha convertido en un biomarcador muy estudiado en la evaluación de la infertilidad masculina, ya que se ha demostrado que los espermatozoides con un daño significativo en el ADN, principalmente con fragmentación de doble cadena, pueden desencadenar alteraciones en el desarrollo embrionario temprano una vez fecundan el ovocito, dando lugar al riesgo de sufrir pérdidas gestacionales durante las primeras semanas del embarazo o problemas con el desarrollo del feto (79–81).

A día de hoy se han implementado diferentes metodologías para la determinación de la fragmentación del ADN espermático, dentro de las que se encuentran: el ensayo de estructura de la cromatina (SCSA), la prueba dispersión de Cromatina espermática (SCD), la prueba de TUNEL y el ensayo cometa, entre otros. El SCSA y la SCD basan su detección de SDF en la capacidad desnaturalizante de la cromatina de los espermatozoides (82–84). El SCSA usa la tinción con naranja de acridina para marcar el ADN de doble cadena en verde y el ADN de cadena sencilla en rojo. Se ha demostrado ampliamente que la proporción de estas dos emisiones determina el porcentaje de fragmentación del ADN, y se han publicado varios estudios para uso clínico (85–90). Además, SCSA también proporciona un parámetro adicional denominado alta tinción del ADN (HDS). Este parámetro es una medida del porcentaje de espermatozoides inmaduros dentro de la muestra de semen, que también se puede tener en cuenta en la evaluación de la infertilidad masculina (79). La prueba SCD evalúa la capacidad de la cromatina espermática para formar halos de dispersión cuando su ADN no está fragmentado y se somete a condiciones desnaturalizantes, lo que permite diferenciar los espermatozoides con ADN no fragmentado (con halo) de los espermatozoides con ADN fragmentado (sin halo). Al igual que los otros métodos, se han realizado estudios que muestran el valor de corte para la prueba de SCD que está asociado a la infertilidad masculina (91–94). Por otro lado, el ensayo TUNEL se basa en utilizar la enzima transferasa de TdT-terminal para marcar los extremos libres 3' del ADN, lo que da como resultado un marcaje de los espermatozoides con roturas en su ADN (95,96). Además, se ha demostrado que se puede incrementar la sensibilidad y especificidad de este método al ser analizado mediante citometría de flujo (97,98). A día de hoy, sin embargo, la técnica que se ha descrito como el método más simple y más sensible para medir roturas de cadena doble y/o cadena sencilla del ADN es el ensayo cometa. El principio metodológico consiste en utilizar la migración del ADN de células individuales usando la electroforesis como método para determinar la presencia de roturas del ADN. La identificación de fragmentos pequeños escindidos fuera del núcleo en forma de una

cola de un cometa es equivalente a la presencia de daño en el ADN en una célula. Por lo tanto, la evaluación del tamaño de la cola, conocido como “cometa”, y el patrón de migración del ADN son usados para evaluar el grado de la fragmentación del ADN celular (99). Diferentes estudios comparativos entre las diferentes técnicas de detección de la fragmentación del ADN describen al ensayo cometa alcalino y la prueba TUNEL como las aproximaciones metodológicas más sensibles, capaces de hacer la distinción entre pacientes fértiles e infértiles y siendo el ensayo cometa la prueba con el mayor poder predictivo del potencial fértil de un individuo (100). No obstante, estudios recientes sugieren que la fragmentación de doble cadena (DSB) tienen un mayor impacto negativo en los resultados reproductivos que la fragmentación de cadena sencilla (SSB) (101). Esto puede explicarse por la separación del ADN materno y paterno en los dos pronúcleos diferentes durante la primera etapa del desarrollo embrionario, que no permite reparar estos DSB por la ausencia de una cadena de ADN complementaria. Además, se ha demostrado que el ciclo celular puede retrasarse si hay un número determinado de roturas de ADN de doble cadena (102). Este efecto ha sido observado en pacientes con un alto porcentaje de DSB en los espermatozoides ya que después de un ciclo de FIV-ICSI mostraba un retraso significativo en el desarrollo del embrión y una menor tasa de implantación (103).

### **Tratamientos antioxidantes para mejorar la fertilidad masculina**

Como se ha mencionado anteriormente, los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daño celular asociados a la presencia de EROS, convirtiéndose así en la primera línea de defensa contra los efectos nocivos generados por el EO (104). Por esta razón, la suplementación con antioxidantes se ha convertido en una práctica cada vez más popular en múltiples campos de la medicina, incluyendo en la medicina reproductiva.

A lo largo de los años, los tratamientos han variado considerablemente implicando el uso de diferentes tipos de compuestos. Los antioxidantes que se han estudiado en el campo de la fertilidad masculina son principalmente: la vitamina A, vitamina E, la vitamina C, los carotenoides, las carnitinas, la coenzima Q10 (ubiquinol), el ácido docosahexaenoico (DHA), la cisteína y los micronutrientes folato, selenio y zinc. La tabla 2 resume las características principales de los compuestos antioxidantes usados con mayor frecuencia en el tratamiento del EO en el semen, su función biológica y el mecanismo de acción que ejerce como antioxidante. No obstante, las terapias antioxidantes más usadas en la actualidad para tratar la infertilidad masculina no se basan en el uso individual de uno de estos compuestos sino en la combinación de varios de ellos. Hoy en día se han diseñado múltiples combinaciones de antioxidantes con el objetivo de obtener un efecto sinérgico y por tanto mejorar los beneficios que podría tener la monoterapia con un compuesto.

En la literatura hay más de 600 estudios que evalúan el impacto de la suplementación antioxidante en la fertilidad masculina (105,106). Muchos de estos estudios evalúan el efecto de diferentes tratamientos antioxidantes sobre los parámetros seminales, y un número más reducido, sobre las tasas de fertilización y embarazo. A pesar de contar con un gran número de estudios, hasta la fecha no se cuenta con conclusiones firmes con respecto a la efectividad clínica de los antioxidantes orales sobre la calidad espermática y su efecto en las tasas del embarazo. Un problema metodológico recurrente que encontramos en los estudios disponibles en la literatura es el tamaño poblacional de éstos, ya que la mayoría de los estudios contienen menos de 100 sujetos analizados. Por tanto, este tipo de estudios presentan una baja potencia estadística y la presencia de un verdadero efecto biológico del tratamiento puede quedar enmascarado. Para superar esta limitación, diferentes autores han utilizado la herramienta estadística del metaanálisis para poder evaluar en conjunto estos estudios individuales, pudiendo aumentar la potencia estadística para detectar un efecto real del tratamiento y evaluar la heterogeneidad de los resultados de los diferentes estudios. En la tabla 3 encontramos un resumen de los 7 metaanálisis disponibles en la literatura (107–113).

En los metaanálisis analizados, los tratamientos antioxidantes más evaluados son la carnitina y la coenzima Q10 (CoQ10). Por un lado, la carnitina es un aminoácido que tiene como función transportar los ácidos grasos hacia el interior de las mitocondrias y se ha evaluado su impacto en la fertilidad masculina en 4 de los 7 metaanálisis realizados (107–109,112). Aunque en algunos parámetros se observan resultados contradictorios, los 4 estudios muestran una mejora en la motilidad de los espermatozoides después del tratamiento con carnitina. Por otro lado, se ha evaluado también en 4 de los 7 metaanálisis realizados (107,111–113) el impacto de la CoQ10m, que es un antioxidante liposoluble sintetizado de forma endógena y un componente esencial del metabolismo energético mitocondrial (114) en los parámetros seminales. Al igual que la carnitina,

el efecto más claro de la CoQ10 es también una mejora en la motilidad de los espermatozoides. Finalmente, los efectos del mineral Selenio y del aminoácido modificado N-Acetil Cisteína (NAC) en la fertilidad masculina han sido de momento evaluados en dos metaanálisis diferentes cada uno (107,108,110,112). En estos estudios se ha visto una mejoría en la concentración y motilidad de los espermatozoides después del tratamiento con Selenio o NAC, y en el volumen seminal y morfología de los espermatozoides únicamente después del tratamiento con NAC.

Se entiende que únicamente los hombres que experimentan EO pueden ser los grandes beneficiados para una terapia antioxidante. A pesar de ello, la mayoría de los estudios que existen hoy en día no examinan el EO en los pacientes antes de participar en los estudios. Está descrito que cerca del 30% de los hombres infértiles presentan EO, por tanto, la inscripción indiscriminada de pacientes sin la evaluación previa del EO diluye el verdadero efecto biológico de la suplementación con antioxidantes y, consecuentemente, el poder del estudio. En definitiva, la inclusión de la determinación del EO por diferentes métodos en los pacientes que se someterán a un tratamiento de suplementación con antioxidantes como un criterio de valoración principal y su posible mejora después del tratamiento, permitirá la identificación de aquellos pacientes que realmente pueden beneficiarse de un tratamiento antioxidante en concreto.

Además, el criterio clínico más relevante que se tendría que analizar después de un tratamiento antioxidante debería ser la tasa de nacimientos vivos y no la calidad espermática. La presencia de una mejora estadísticamente significativa en la concentración, la motilidad y la morfología espermática no tiene por qué tener una importancia clínica respecto al potencial fértil de un individuo. Se han realizado un gran número de estudios que examinan la capacidad de diferentes tipos de suplementos antioxidantes para mejorar la función reproductiva masculina, sin embargo, aún no está claro si la terapia antioxidante masculina antes de la concepción puede realmente mejorar las posibilidades de una pareja de convertirse en padres.

## **Conclusión**

En el campo de la fertilidad el mayor foco de estudio ha sido principalmente la mujer. Esto se ve reflejado en que actualmente la evaluación del varón infértil se basa únicamente en la observación tanto macroscópica como microscópica del eyaculado y en que, actualmente, no existe ningún tratamiento avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que pueda ser utilizado en la práctica clínica para mejorar la fertilidad en los hombres. La OMS recomienda la realización del seminograma para la evaluación de la fertilidad masculina, como un examen general de la calidad del semen. Sin embargo, dado que la infertilidad masculina es un problema multifactorial, es necesario estandarizar e implementar metodologías capaces de identificar las posibles causas de la infertilidad para mejorar el tratamiento y el seguimiento del factor masculino dentro de los procedimientos de reproducción asistida. En las últimas décadas se ha propuesto que el daño en los espermatozoides ocasionado por el EO del semen puede ser el origen de la infertilidad de un porcentaje significativo de los pacientes infértiles y cientos de estudios han reportado los efectos beneficiosos o terapéuticos de los antioxidantes en la fertilidad masculina. No obstante, la falta de un método estandarizado para medir ROS seminal de alta fiabilidad, el uso de una gran cantidad de tipos y dosis diferentes de antioxidantes y la falta de estudios con la potencia estadística adecuada para analizar los resultados de los antioxidantes sobre las tasas de fertilización y de embarazo impide que se puedan llegar a conclusiones definitivas. En definitiva, uno de los grandes retos para la Medicina Reproductiva moderna, es determinar las mejores metodologías para evaluar el EO que permitan identificar el tipo de pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento antioxidante así como determinar el tipo, dosis y duración de la mejor terapia antioxidante.

## **Agradecimientos**

Financiado en parte por el Proyecto del Ministerio de Economía y Competividad (España) fondos FEDER 'una manera de hacer Europa', con referencia PI20/00936 a RO.

## **Referencias**

1. World Health Organization. *INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF DISEASES- Mortality and Morbidity Statistics*. World Health Organization (2021).

2. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S. & Stevens, G. A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine* 9, e1001356 (2012).
3. Skakkebaek, N. E. *et al.* Populations, decreasing fertility, and reproductive health. *Lancet (London, England)* 393, 1500–1501 (2019).
4. Levine, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human reproduction update* 23, 646–659 (2017).
5. Lv, M. Q. *et al.* Temporal trends in semen concentration and count among 327 373 Chinese healthy men from 1981 to 2019: a systematic review. *Human reproduction (Oxford, England)* 36, 1751–1775 (2021).
6. Salonia, A. *et al.* European Association of Urology Guidelines on Sexual and Reproductive Health-2021 Update: Male Sexual Dysfunction. *European urology* 80, 333–357 (2021).
7. W Tieg, M. A. *et al.* Total motile sperm count trend over time across two continents: evaluation of semen analyses from 119,972 infertile men. *Fertility and Sterility* 110, e27 (2018).
8. Aitken, R. J. & Drevet, J. R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9, 1-19 (2020).
9. Balawender, K. & Orkisz, S. The impact of selected modifiable lifestyle factors on male fertility in the modern world. *Central European journal of urology* 73, 1–6 (2020).
10. Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M. & Agarwal, A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 11, 1-15 (2013).
11. Ambar, R. F., Parekh, N. & Agarwal, A. Recent advances and controversies in diagnosing and treating male infertility. *Faculty reviews* 9, 1-8 (2020).
12. Showell, M. G. *et al.* Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014, 1-170 (2014).
13. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international* 2014, 1-19 (2014).
14. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology* 194, 7–15 (2011).
15. Aitken, R. J. & Baker, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, fertility, and development* 16, 581–588 (2004).
16. Wright, C., Milne, S. & Leeson, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online* 28, 684–703 (2014).
17. Aitken, R. J., Clarkson, J. S. & Fishel, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction* 41, 183–197 (1989).
18. Sharma, R. K., Pasqualotto, F. F., Nelson, D. R., Thomas, A. J. & Agarwal, A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology* 22, 575–583 (2001).
19. Aitken, R. J., Jones, K. T. & Robertson, S. A. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *Journal of andrology* 33, 1096–1106 (2012).
20. Torra-Massana, M. *et al.* Altered mitochondrial function in spermatozoa from patients with repetitive fertilization failure after ICSI revealed by

- proteomics. *Andrology* 9, 1192–1204 (2021).
21. Gomez, E. *et al.* Development of an Image Analysis System to Monitor the Retention of Residual Cytoplasm by Human Spermatozoa: Correlation With Biochemical Markers of the Cytoplasmic Space, Oxidative Stress, and Sperm Function. *Journal of Andrology* 17, 276–287 (1996).
  22. Henkel, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology* 13, 43–52 (2011).
  23. la Vignera, S., Condorelli, R. A., Balercia, G., Vicari, E. & Calogero, A. E. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian journal of andrology* 15, 221–225 (2013).
  24. Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A. & Esteves, S. C. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European urology* 70, 635–645 (2016).
  25. Borges, E. *et al.* Paternal lifestyle factors in relation to semen quality and in vitro reproductive outcomes. *Andrologia* 50, e13090 (2018).
  26. Alberts, B. *et al.* *Essential Cell Biology: Bruce Alberts: Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive.* Garland Science (2013). ISBN: 978-0-8153-4454-4.
  27. Shahidi, F. & Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18, 757–781 (2015).
  28. Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal* 15, 1-22 (2016).
  29. Alahmar, A. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *Journal of human reproductive sciences* 12, 4–18 (2019).
  30. Fraczek, M. & Kurpisz, M. [The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 59, 523–534 (2005).
  31. Fraczek, M. & Kurpisz, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw* 59, 523-534 (2005).
  32. Yan, L. *et al.* Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *Journal of assisted reproduction and genetics* 31, 549–554 (2014).
  33. Macanovic, B. *et al.* Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Disease markers* 2015, 1-5 (2015).
  34. Yeung, C. H. *et al.* Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. *Molecular human reproduction* 4, 835–839 (1998).
  35. Perreault, S. D., Barbee, R. R. & Slott, V. L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental biology* 125, 181–186 (1988).
  36. Calvin, H. I., Grosshans, K. & Blake, E. J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Research* 14, 265–275 (1986).
  37. Fatima, S. Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction. In *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress*. IntechOpen (2018) doi:10.5772/INTECHOPEN.74763.

38. John Aitken, R. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular human reproduction* 3, 169–173 (1997).
39. Mayorga-Torres, J. M., Agarwal, A., Roychoudhury, S., Cadavid, A. & Cardona-Maya, W. D. Can a Short Term of Repeated Ejaculations Affect Seminal Parameters? *Journal of Reproduction & Infertility* 17, 177-183 (2016).
40. Agarwal, A. *et al.* Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *The world journal of men's health* 37, 296–312 (2019).
41. Marrocco, I., Altieri, F. & Peluso, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 1-32 (2017).
42. Katerji, M., Filippova, M. & Duerksen-Hughes, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019, 1-29 (2019).
43. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. vol. FIFTH EDITION (2010).
44. Agarwal, A., Allamaneni, S. S. R. & Said, T. M. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reproductive biomedicine online* 9, 466–468 (2004).
45. Homa, S. T., Vessey, W., Perez-Miranda, A., Riyait, T. & Agarwal, A. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *Journal of assisted reproduction and genetics* 32, 757–764 (2015).
46. Gosalvez, J., Tvrda, E. & Agarwal, A. Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. *Journal of assisted reproduction and genetics* 34, 697–707 (2017).
47. Zielonka, J., Lambeth, J. D. & Kalyanaraman, B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free radical biology & medicine* 65, 1310–1314 (2013).
48. Olowe, R., Sandouka, S., Saadi, A. & Shekh-ahmad, T. Approaches for Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress Quantification in Epilepsy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9, 1–26 (2020).
49. Tunc, O., Thompson, J. & Tremellen, K. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *International journal of andrology* 33, 13–21 (2010).
50. Huang, C. *et al.* Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. *Oncotarget* 9, 24494–24513 (2018).
51. Aitken, R. J. *et al.* On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology* 1, 192–205 (2013).
52. Mayorga-Torres, B. J. M., Camargo, M., Cadavid, P., du Plessis, S. S. & Cardona Maya, W. D. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *Andrologia* 49, 1-7(2017).
53. Zandieh, Z. *et al.* Comparing reactive oxygen species and DNA fragmentation in semen samples of unexplained infertile and healthy fertile men. *Irish journal of medical science* 187, 657–662 (2018).
54. Uribe, P., Boguen, R., Treulen, F., Sánchez, R. & Villegas, J. v. Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial

- membrane potential in human spermatozoa. *Molecular human reproduction* 21, 237–243 (2015).
55. Serrano, R. *et al.* Molecular Mechanisms Involved in the Impairment of Boar Sperm Motility by Peroxynitrite-Induced Nitrosative Stress. *International journal of molecular sciences* 21, 1–18 (2020).
  56. Agarwal, A., Roychoudhury, S., Bjugstad, K. B. & Cho, C. L. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? *Therapeutic advances in urology* 8, 302–318 (2016).
  57. Agarwal, A. *et al.* Multi-center evaluation of oxidation-reduction potential by the MiOXSYS in males with abnormal semen. *Asian journal of andrology* 21, 565–569 (2019).
  58. Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P. & Mahajan, R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology* 7, 65–74 (2009).
  59. Colagar, A. H., Karimi, F. & Jorsaraei, S. G. A. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men. *Iranian Red Crescent medical journal* 15, 780–785 (2013).
  60. Davies, M. J., Fu, S., Wang, H. & Dean, R. T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 1151–1163 (1999).
  61. Zhu, J. ling, Cai, Y. qin, Long, S. lian, Chen, Z. & Mo, Z. cheng. The role of advanced glycation end products in human infertility. *Life sciences* 255, 1–10 (2020).
  62. Omolaoye, T. S. & du Plessis, S. S. Male infertility: A proximate look at the advanced glycation end products. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 93, 169–177 (2020).
  63. Karimi, J., Goodarzi, M. T., Tavilani, H., Khodadadi, I. & Amiri, I. Relationship between advanced glycation end products and increased lipid peroxidation in semen of diabetic men. *Diabetes research and clinical practice* 91, 61–66 (2011).
  64. Fraga, C. G. *et al.* Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11003–11006 (1991).
  65. Loft, S. *et al.* Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)* 18, 1265–1272 (2003).
  66. Lewis, S. E. M. & Aitken, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and tissue research* 322, 33–41 (2005).
  67. Cambi, M. *et al.* Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction (Cambridge, England)* 145, 227–235 (2013).
  68. Ghaleno, L. R., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A. & Valojerdi, M. R. Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10, 1–15 (2021).
  69. Agarwal, A., Makker, K. & Sharma, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)* 59, 2–11 (2008).
  70. Makker, K., Agarwal, A. & Sharma, R. Oxidative stress & male infertility. *The Indian Journal of Medical Research* 129, 357–367 (2009).
  71. Aitken, R. J., de Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A. & McLachlan, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and

- sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human reproduction (Oxford, England)* 25, 2415–2426 (2010).
72. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update* 12, 417–435 (2006).
  73. Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S. & Oliva, R. Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *Journal of andrology* 32, 324–332 (2011).
  74. Barrachina, F., Soler-Ventura, A., Oliva, R. & Jodar, M. Sperm Nucleoproteins (Histones and Protamines). in *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage* (eds. Zini, A. & Agarwal, A.) 31–51 (Springer, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-71815-6\_2.
  75. Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R. & Spadafora, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and cell biology* 16, 1087–1097 (1997).
  76. Sailer, B. L., Sarkar, L. J., Bjordahl, J. A., Jost, L. K. & Evenson, D. P. Effects of Heat Stress on Mouse Testicular Cells and Sperm Chromatin Structure. *Journal of Andrology* 18, 294–301 (1997).
  77. Sotolongo, B., Huang, T. T. F., Isenberger, E. & Ward, W. S. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of andrology* 26, 272–280 (2005).
  78. Sakkas, D. & Alvarez, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility* 93, 1027–1036 (2010).
  79. Evenson, D. P. *et al.* Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction (Oxford, England)* 14, 1039–1049 (1999).
  80. Carrell, D. T. *et al.* Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Archives of andrology* 49, 49–55 (2003).
  81. Lewis, S. E. M. & Simon, L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Human fertility (Cambridge, England)* 13, 201–207 (2010).
  82. Fernández, J. L. *et al.* Halosperm<sup>®</sup> is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 84, 860–860 (2005).
  83. Evenson, D. P. & Wixon, R. Comparison of the Halosperm<sup>®</sup> test kit with the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA<sup>®</sup>) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertility and Sterility* 84, 846–849 (2005).
  84. Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. & Melamed, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210, 1131–1133 (1980).
  85. Evenson, D. & Jost, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in cell science: an official journal of the Society for In Vitro Biology* 22, 169–189 (2000).
  86. Evenson, D. P., Larson, K. L. & Jost, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of andrology* 23, 25–43 (2002).
  87. Bungum, M. *et al.* The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human reproduction (Oxford, England)* 19, 1401–1408 (2004).
  88. Virro, M. R., Larson-Cook, K. L. & Evenson, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst



- development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility* 81, 1289–1295 (2004).
89. Nijs, M. *et al.* Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reproductive biomedicine online* 19, 671–684 (2009).
  90. Venkatesh, S. *et al.* Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 18, 1005–1013 (2011).
  91. Fernández, J. L. *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility* 84, 833–842 (2005).
  92. Velez de la Calle, J. F. *et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertility and sterility* 90, 1792–1799 (2008).
  93. Nuñez-Calonge, R. *et al.* An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 19, 1163–1168 (2012).
  94. Ribas-Maynou, J. *et al.* Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human reproduction (Oxford, England)* 27, 652–658 (2012).
  95. Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F. & Bleau, G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human reproduction (Oxford, England)* 20, 3446–3451 (2005).
  96. Sharma, R. K. *et al.* TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 76, 1380–1386 (2010).
  97. Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Ballecà, J. L. & Oliva, R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 71, 1011–1018 (2007).
  98. Mitchell, L. A., de Iuliis, G. N. & Aitken, R. J. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *International journal of andrology* 34, 2–13 (2011).
  99. Simon, L., Aston, K. I., Emery, B. R., Hotaling, J. & Carrell, D. T. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. *Andrologia* 49, 1–12 (2017).
  100. Javed, A., Talkad, M. S. & Ramaiah, M. K. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and experimental reproductive medicine* 46, 14–21 (2019).
  101. Agarwal, A., Barbăroșie, C., Ambar, R. & Finelli, R. The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. *International journal of molecular sciences* 21, 1–14 (2020).
  102. van den Berg, J. *et al.* A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression. *Nucleic acids research* 46, 10132–10144 (2018).
  103. Casanovas, A. *et al.* Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and*

*Sterility* 111, 699-707.e1 (2019).

104. Sharifi-Rad, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology* 11, 1-21 (2020).
105. Balleascà, J. L., Oliva Virgili, R., Espinosa, N. & Corral, J. M. Efecto de la administración de un complejo de antioxidantes en pacientes afectos de astenoteratozoospermia idiopática. *Revista internacional de Andrología: salud sexual y reproductiva, ISSN-e 1698-031X, Vol. 10, N° 2, 2012, págs. 51-56* 10, 51-56 (2012).
106. Mateu, L. *et al.* Tratamiento antioxidante en hombres con infertilidad idiopática. *Revista Internacional de Andrología* 15, 45-50 (2017).
107. Sharma, A., Sharma, G. & Kumar, R. Systematic Review and Meta-analysis on Effect of Carnitine, Coenzyme Q10 and Selenium on Pregnancy and Semen Parameters in Couples With Idiopathic Male Infertility. *Urology* (2021) doi:10.1016/J.UROLOGY.2021.10.041.
108. Wei, G. *et al.* A Meta-Analysis of the Efficacy of L-Carnitine/L-Acetyl-Carnitine or N-Acetyl-Cysteine in Men With Idiopathic Asthenozoospermia. *American journal of men's health* 15, 1-11 (2021).
109. Zhang, X., Cui, Y., Dong, L., Sun, M. & Zhang, Y. The efficacy of combined l-carnitine and l-acetyl carnitine in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: A systematic review and meta-analysis. *Andrologia* 52, e13470 (2020).
110. Zhou, Z., Cui, Y., Zhang, X. & Zhang, Y. The role of N-acetyl-cysteine (NAC) orally daily on the sperm parameters and serum hormones in idiopathic infertile men: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Andrologia* 53, e13953 (2021).
111. Vishvkarma, R., Alahmar, A. T., Gupta, G. & Rajender, S. Coenzyme Q10 effect on semen parameters: Profound or meagre? *Andrologia* 52, e13570 (2020).
112. Buhling, K., Schumacher, A., Eulenburg, C. zu & Laakmann, E. Influence of oral vitamin and mineral supplementation on male infertility: a meta-analysis and systematic review. *Reproductive biomedicine online* 39, 269-279 (2019).
113. Lafuente, R. *et al.* Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics* 30, 1147-1156 (2013).
114. Quinn, P. J., Fabisiak, J. P. & Kagan, V. E. Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q. *BioFactors (Oxford, England)* 9, 149-154 (1999).

# ANDROLOGÍA REPRODUCTIVA DEL VARÓN ADOLESCENTE

Fernando Vásquez Rengifo Médico, MSc, PhD.

Director Grupo de investigación en Salud Sexual y Reproductiva, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

Autor corresponsal: Dr. Fernando Vásquez Rengifo. Correo electrónico: [fvasquez@uninorte.edu.co](mailto:fvasquez@uninorte.edu.co)

## Cápsula

La producción de espermatozoides se inicia en la adolescencia y es influenciada por diversos factores, desde la vida intrauterina y la infancia. El capítulo explica este proceso biológico y clínico.

## Introducción

La adolescencia masculina es una etapa del ciclo de vida, intermedia entre la infancia y la vida adulta. Son muchos los cambios biológicos que se presentan, siendo todos ellos fundamentales para desarrollar una vida adulta funcional. Durante la adolescencia se adquiere la capacidad reproductiva, cambia su sentir de la sexualidad, adquiere su estatura de adulto y suceden cambios en su desarrollo corporal, afectivo, social y de identidad sexual. Este capítulo se enfoca en explicar cómo sucede el inicio y el desarrollo de la fertilidad del varón, cuáles son las etapas y cómo puede verse afectada en forma positiva o negativa por su estilo de vida, por factores genéticos, metabólicos, infecciosos y del medio ambiente.

## Adrenarquia: inicio de síntesis de hormonas suprarrenales

La adrenarquia es la etapa inicial de la adolescencia y precede a la síntesis de las gonadotropinas FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante). Se produce por la maduración de la zona reticular de las glándulas suprarrenales, con lo cual hay un aumento de síntesis de los andrógenos precursores de dehidroepiandrosterona (DHEA) y el Sulfato dehidroepiandrosterona (DHEA-S). Para algunos investigadores, la edad de inicio es a partir de los 9 años. Cuando sucede antes de los 9 años se considera que es Adrenarquia Precoz (AP). La AP es distinta de la adolescencia precoz, que se manifiesta con el desarrollo de características sexuales secundarias que incluyen el crecimiento testicular (1).

Clínicamente, se caracteriza por un cambio en el olor del sudor, por la aparición de vello púbico y axilar. El mecanismo de producción de la adrenarquia no se conoce; se especula que existe un factor liberador de andrógenos suprarrenales independiente de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Estudios clínicos sugieren que la insulina, la somatomedina C o factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y la Hormona de Crecimiento (GH) tienen influencia en la edad de la adrenarquia (2). La adrenarquia tiene relación temporal con la Gonadarquia; son considerados como eventos independientes y regulados por mecanismos diferentes. Puede existir Gonadarquia en ausencia de adrenarquia como sucede en niños con insuficiencia adrenal.

La AP puede presentarse en algunos niños que tengan hiperplasia adrenal congénita o tumores secretores de andrógenos de origen suprarrenal o testicular; en la mayoría de casos se ha asociado a niños y niñas con bajo peso al nacer; y hay estudios que indican la presencia de resistencia a la insulina, especialmente en niños con obesidad. Esta población tiene más riesgos de presentar diabetes y problemas cardiovasculares en la vida adulta, por lo cual una sana alimentación es importante para prevenir futuras complicaciones (3,4,5).

## **Gonadarquia: inicio de síntesis de gonadotrofinas**

El inicio de la secreción de la FSH y la LH en la adenohipófisis se conoce como Gonadarquia y se da gracias al inicio de la síntesis pulsátil del factor hipotalámico GnRH. Durante la infancia el GnRH se sintetiza en forma no pulsátil y las concentraciones séricas de FSH y LH son mínimas. Al iniciarse la liberación de GnRH, aparecen en la adenohipófisis los receptores de FSH en las células de Sertoli, y de LH en Leydig, mecanismo que inicia la reorganización testicular, iniciándose la construcción de la barrera hematotesticular, la meiosis y la síntesis de testosterona. El desarrollo normal de la Gonadarquia es fundamental para la fertilidad del hombre y para su desarrollo sexual (6).

La ausencia congénita de las neuronas que sintetizan GnRH se conoce como el síndrome de Kallman y se caracteriza por el retraso de las manifestaciones clínicas de la adolescencia. Si no hay síntesis de FSH, LH y testosterona, no se producen espermatozoides ni crecimiento de los testículos ni hay eyaculación; el niño – adolescente, al no tener testosterona, no desarrolla el crecimiento de los órganos genitales internos y externos. En la mayoría de los casos se presenta anosmia, incapacidad total para detectar olores. Para su diagnóstico es necesario cuantificar las gonadotrofinas, la testosterona, la prolactina, las cuales deben de tener valores de referencia de niño. Su tratamiento es la administración de suplencia hormonal: testosterona de por vida para desarrollar y mantener el desarrollo sexual y prevenir la osteoporosis. La suplencia con testosterona no es suficiente para iniciar la espermatogénesis, por lo cual cuando el joven decida tener hijos, deberá recibir durante uno o dos años FSH para producir espermatozoides. Una vez deje de aplicarse la FSH retornara la azoospermia (7).

Clínicamente la Gonadarquia se puede monitorear por el crecimiento longitudinal y volumétrico de los testículos que pasan de un tamaño infantil (4 cc) a volúmenes superiores. Este crecimiento puede ser valorado con el orquidometro de Prader o por seguimiento ecográfico: durante el crecimiento de los testículos hay cambios en el color y la textura de la piel del escroto, el cual se torna inicialmente más delgado, liso de un color claro.

## **Oigarquia: primera eyaculación**

La eyaculación es un proceso fisiológico que tiene dos etapas: una de **emisión** de los líquidos producidos por las dos vesículas seminales y la próstata hacia la uretra prostática gracias a la acción de la dehidrotestosterona y otra de **expulsión** que se produce cuando la cantidad de líquido seminal llena la cavidad virtual de la uretra prostática desencadenando contracciones rítmicas de los músculos de la uretra prostática y del piso pélvico; fisiológicamente está relacionada con la presencia del orgasmo.

La primera eyaculación consciente fue definida por Laron Z. en 1980 (8) como Oigarquia. Ocurre por auto-estímulo o por sueños nocturnos; tiene un significado fisiológico semejante a la menarquia o primera menstruación de la mujer pero a diferencia de ella existe poca información referente a su edad de aparición y las características del desarrollo que la acompañan. La aparición del líquido seminal no significa que existe presencia de espermatozoides en el semen, por lo cual se puede considerar la Oigarquia como un signo del desarrollo sexual y no del desarrollo de la espermatogénesis.

La edad de la oigarquia varía entre los 10 a 15 años según diferentes estudios publicados. Laron (8) reporta en adolescentes israelitas una edad promedio de 13,5 años de edad ósea con un rango de 12,5 a 15,5 años; Carlier y Steeno en 1.985 (9) reportaron la edad promedio en adolescentes belgas de 13 años y 2 meses; García-Baltasar J. (10), en adolescentes mexicanos en 1.994 reportaron a los 14 años y Ji CY, Ohsawa S. (11) en el año 2.000 en una población urbana de adolescentes chinos la edad promedio de 14.2 años y de 14.8 años para adolescentes que viven en zonas rurales. En Colombia, Vásquez F. – Bustos-Obregón E. (12), en el 2004 reportaron un promedio de edad de 12.8 + 1.0 años; la oigarquia en este estudio se presentó generalmente en estadio de Tanner 3 y 4 (12).

Las diferencias en los promedios de edad de los estudios pueden ser explicados entre otras causas por tratarse de poblaciones con razas diferentes, diferencias genéticas, nivel socioeconómico, estado nutricional y la influencia del medio ambiente. No hay estudios que indiquen si la edad de la primera eyaculación se está presentando más temprano que en las décadas anteriores, tal como si ha sucedido con la menarquia donde se ha observado que en los países industrializados hay una tendencia hacia una menarquia en edades más tempranas. Las causas de la disminución de la edad de la menarquía son poco claras, pero existe una

interpretación que considera que es un efecto de las condiciones alimenticias y ambientales (13). Igual hipótesis puede plantearse para la oigarquia.

### **Significado emocional y cultural de la oigarquia**

La oigarquia al igual que la menarquía son eventos con un impacto en la vida emocional y por lo tanto son de fácil recordación. El varón adolescente relaciona este evento con el bienestar sexual. Dada que la mayoría de las veces la oigarquia ocurre por auto estímulo y que este evento está directamente relacionado con el placer sexual, la mayor parte de las culturas lo abordan es a través del silencio, los mitos, tabúes, moralismos, lo que hace que este evento ocurra en forma silenciosa. En cambio, en la menarquía la familia y la sociedad dan un mensaje educativo a la adolescente que les informa que a partir de ese momento tiene la capacidad de quedar embarazadas. Cuando se le pregunta a los varones adolescentes por lo que sintieron en ese momento las respuestas más frecuentes están relacionadas con el placer, el silencio, sentimientos de orgullo de convertirse en hombres, algunos pueden tener sentimientos de culpa y angustia, temor, y un porcentaje no muy alto entienden que ya pueden tener la capacidad de tener hijos, y algunos sienten que a partir de ese momento pueden iniciar su vida sexual. Todos estos cambios en la forma de sentir las emociones están relacionados en parte con las acciones de la testosterona en el sistema nervioso central (12).

### **Pubarquia**

Se entiende por pubarquia el momento en que se da la aparición del vello púbico. Son los andrógenos suprarrenales y testiculares los responsables de esta acción. Inicialmente el vello es escaso, de color claro y delgado. Cuando aumenta la síntesis de andrógenos el vello es más numeroso, su color se oscurece y se convierte en un vello grueso y enroscado. Su cantidad y distribución se utilizan como parámetros clínicos del crecimiento y desarrollo del varón adolescente según clasificación de Tanner (14).

### **Espermarquia: aparición de los primeros espermatozoides en el líquido seminal**

Los primeros estudios que permitieron establecer la edad a partir de la cual se producen los espermatozoides fueron realizados en orina de adolescentes, proceso conocido como **espermaturia**; también se ha evaluado a través de biopsias testiculares y en el líquido seminal.

Los estudios en orina estaban basados en la observación de que los espermatozoides después de una eyaculación voluntaria o involuntaria aparecen en la orina al arrastrarlos de la uretra prostática. Baldwin en 1.928 (15) publicó el primer estudio utilizando la primera orina de la mañana en 123 adolescentes en el rango de edad de 9 a 17 años, encontrando espermatozoides en 29 de ellas. En 1.978 Richardson & Short (16) recolectaron muestras de orina con intervalo de 6 meses durante 7 años, en 134 niños que tenían 9 años al inicio del estudio; reportando espermaturia en un 2% a la edad de 11 años, 15% entre 12 y 13 años y 24% a los 14 años.

En 1.979 Hirsh (17) reportaron en 429 adolescentes israelitas la espermaturia en un rango de edad entre 11 y 16 años. En 1.986 Nielsen (18), reportaron la espermaturia en 40 niños de Edimburgo a los 13.4 años. En 1.989, Kulin (19) reportó la espermaturia en 26 jóvenes norteamericanos a una edad promedio de 14 años.

El primer estudio realizado en biopsias de testículos de adolescentes lo realizaron Sniffen (20) en 1.950, y concluye que la espermatogénesis se establece gradualmente entre los 12 y 16 años. Charny (21) en 1.952, encuentra que un incremento del diámetro del túbulo seminífero acompaña la maduración de la espermatogénesis, entre los 11 y 15 años.

La aparición de los primeros espermatozoides en el semen es un fenómeno conocido como **espermarquia** y al parecer es posterior e inmediato a la oigarquia. La espermatogénesis depende principalmente del estímulo de FSH, LH y testosterona en las células de Sertoli, Leydig y los túbulos seminíferos

El primer estudio en líquido seminal lo publica Janczewski & Bablock en 1.985 (22), en adolescentes polacos, encontrando que en el 80% de las primeras eyaculaciones no hay espermatozoides; la producción de espermatozoides va aumentando a partir del tercer mes pos oigarquia. Vásquez & Bustos-Obregón (12) reportan en el año 2.004 en una población de 161

adolescentes colombianos un promedio de 28 millones de espermatozoides durante el primer año post-oigarquia; 54 millones a los 2 años; 119 millones a los 3 años y 164 millones de espermatozoides a los 4 años, coincidiendo con lo reportado por Janczewski & Bablock; la espermatogénesis se da en forma gradual y lenta. Mori reportó en adolescentes brasileros un recuento total de 150 millones de espermatozoides en etapa 5 de Tanner y de 67.8 millones en etapa 4. (23)

Los estudios han reportado en adolescentes en etapa 5 de Tanner, oligozoospermias en porcentajes entre 7% y el 15.8% y azoospermia en un 1.8% Presumiblemente esta población constituye una población de riesgo de infertilidad temprana (12, 23).

Carmona (24) en el año 2.012 reporta en 21 adolescentes colombianos la presencia de espermatozoides en el líquido seminal a los tres meses del inicio de la primera eyaculación. A los 9 meses observó que el 100% de los adolescentes tenían espermatozoides. Estos datos sugieren que al finalizar el primer año post-oigarquia hay un alto porcentaje de adolescentes que tienen una alta capacidad reproductiva.

En resumen, la mayoría de las primeras eyaculaciones antes de 3 meses no tienen espermatozoides y posterior a ese tiempo se inicia una producción de espermatozoides que permite que la mayoría de los adolescentes tengan al terminar el primer año posterior a la primera eyaculación una cantidad de espermatozoides semejante al mínimo normal del adulto.

### **Parametros seminales en la adolescencia**

Los estudios publicados de spermograma realizados en adolescentes son pocos y no permiten tener un consenso sobre los valores de referencia en esta población. Janczewski & Bablock (21), Vasquez & Bustos-Obregón (12), Mouri (23), Paris (25) y Kliesch (26).

A continuación, se presentan algunos datos de las variables del spermograma en adolescentes.

### **Volumen**

El espermatozoide necesita del líquido seminal para su desplazamiento. El volumen depende de las concentraciones de testosterona que estimulan las vesículas seminales y la próstata. Las primeras eyaculaciones tienen un promedio de 0.1cc a 0.6 cc, el cual se va incrementando hasta lograr valores superiores a 2 cc en un periodo de dos años posterior a la primera eyaculación (12,22).

### **pH**

El pH seminal alcalino es fundamental para la supervivencia del espermatozoide. Las primeras eyaculaciones tienen un pH promedio de 8.7; posteriormente el pH disminuye estando siempre en rangos alcalinos (12).

### **Mucolisis**

El 98,7% de los adolescentes presentaron una licuefacción completa, lo cual sugiere que la mucólisis es un proceso que se instaura tempranamente. Janczewski & bablock en 1985 reportaron que el proceso de mucólisis se produce alrededor de los 11 meses después de la primera eyaculación, que coincide con los resultados de Vásquez & bustos-obregón (12).

### **Movilidad**

La movilidad del espermatozoide es un criterio determinante de su capacidad reproductiva. Los resultados presentados indican que en la adolescencia a media que pasa el tiempo pos primera eyaculación se incrementa el porcentaje de movilidad del espermatozoide. El porcentaje promedio de espermatozoides móviles reportado por vasquez & bustos obregón (12) fue de  $59.2 \pm 17.6$ .

### **Morfología**

La morfología es un factor predictivo de la capacidad reproductiva del espermatozoide. Los estudios de espermograma en adolescentes indican que es un proceso gradual donde el porcentaje de formas normales se incrementa con la edad pero que desde el inicio el porcentaje de formas anormales predomina en forma importante. El promedio de formas normales reportado por Vásquez fue de 23,4% (12,27) semejante con lo reportado por Paris (25) y Kliesch y colaboradores (26).

### **Valoración de las hormonas reproductivas durante la adolescencia**

La valoración endocrina de la fertilidad en el hombre, se realiza principalmente con la titulación de la FSH, LH y testosterona. Durante la infancia y la etapa de la adrenarquia las concentraciones de las tres hormonas son inferiores al valor mínimo de referencia del adulto. La FSH se correlaciona con el inicio y desarrollo de la espermatogénesis, la LH con la síntesis de testosterona. El aumento de estas hormonas se inicia en la etapa de la Gonadarquia y su síntesis aumenta en forma gradual. Cuando se presenta la oigarquia y la espermarquia las concentraciones de FSH, LH y testosterona ya están dentro de los rangos de referencia utilizados en el adulto. Estas hormonas son útiles en la valoración de la capacidad reproductiva del adolescente (12,13).

### **Factores que afectan la espermatogénesis del adolescente**

La edad de mejor fertilidad del hombre es al finalizar la adolescencia y durante la etapa de adulto joven. Pero según lo reportado por las investigaciones hay un porcentaje importante de adolescentes que tienen oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia y azoospermia. ¿Cuáles son las causas que pueden alterar la fertilidad del adolescente?

### **La historia clínica nos remite a la etapa del embarazo y a la infancia.**

Alrededor de la 6 semana de embarazo ocurre en el embrión la migración de las células primordiales a la cresta urogenital. Si este evento tiene un proceso de desarrollo normal, el embrión tendrá en sus testículos una cantidad suficiente de espermatogonias que le permitirá tener una cantidad normal de espermatozoides a partir de la adolescencia. Por el contrario, si hay una disrupción de la migración tendremos testículos con pocas o ninguna espermatogonia dando origen a las oligozoospermia y azoospermia en la adolescencia.

Un factor a considerar es el genético, que, aunque se presenta con una baja frecuencia, tiene el agravante de ser una causa no tratable en la mayor parte de los casos. Las anomalías cromosómicas, las microdeleciones del cromosoma Y, las mutaciones del gen de la fibrosis quística asociada a la agenesia bilateral de los conductos deferentes son los factores genéticos más frecuentes asociados a la infertilidad del hombre (28).

El mal descenso testicular (criptorquidia), es la anomalía congénita más frecuente del tracto genitourinario del niño, su prevalencia depende de la edad gestacional y el peso del niño; es un factor asociado a la infertilidad y el cáncer testicular. El descenso y fijación de los testículos criptorquídicos se realiza alrededor del año de nacimiento. (29) En la infancia el eje hipotálamo-hipófisis-testículo está inactivo y se considera que no hay factores importantes que puedan alterar la fertilidad en la infancia.

En la adolescencia, desde la adrenarquia hasta que se logra una madurez de la espermatogénesis (alrededor de los 16 a 18 años) existen factores de riesgo que pueden alterar la fertilidad. El varicocele testicular, (30,31), la inflamación de los testículos por paperas, la obesidad, (32,33), enfermedades infecciosas de diferente etiología, el uso continuo de celulares de alta gama, tratamientos médicos farmacológicos, radiaciones, el consumo de drogas adictivas como el alcohol, la marihuana y otras, deben ser vista como posibles factores de riesgo reproductivo para el varón adolescente. (34-39)

### **Conclusión**

La fertilidad del joven y hombre adulto es dependiente en gran parte del desarrollo normal de la espermatogénesis en la adolescencia. Actualmente muchos hombres están postergando la paternidad y la sociedad estimula este aplazamiento en contravía de la biología natural. La fertilidad en la adolescencia es alta aun en circunstancias de que tenga patologías asociadas a la

infertilidad. Pero con el tiempo el hombre pierde parte de esa capacidad reproductiva. La consulta médica durante la adolescencia es la mejor manera de identificar a tiempo problemas que al futuro puedan convertir en infértil a la persona.

## Agradecimientos

Al profesor y amigo Eduardo Bustos-Obregón (Q.E.P.D) quien me inició en el estudio de la andrología y me acompañó conjuntamente con el profesor Joseph Egozcue (Q.E.P.D) como directores de mi tesis doctoral, en la valoración clínica y biológica del desarrollo de la fertilidad del adolescente. A los profesores Javier Regadera, José Pomerol, Carles Soler, Oswaldo Rajmil, José Luis Ballescá y Ana Puigvert.

## Referencias

1. Witchel SF, Pinto B, Burghard AC, Oberfield SE. Update on adrenarche in *Curr Opin Pediatr.* (2020); 32: 574–581.
2. Guercio G, Rivarola MA, Chaler E, Maceiras M, Belgorosky A. Relationship between the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis, insulin sensitivity, and adrenal androgens in normal prepubertal and pubertal girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab* (2003); 88:1389–1393.
3. Denburg MR, Silfen, ME, Manibo, AM, Chin, D., Levine, LS, Ferin, M., Oberfield, SE. Insulin Sensitivity and the Insulin-Like Growth Factor System in Prepubertal Boys with Premature Adrenarche In *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2002); 87: 5604–5609.
4. Idkowiak J, Lavery GG, Dhir V, Barrett TG, Stewart PM, Krone N, Arlt W. Premature adrenarche: novel lessons from early onset androgen excess. *Eur J Endocrinol.* (2011); 165:189-207.
5. Novello L, Speiser PW. Premature Adrenarche. *Pediatr Ann.* (2018); 47:e7-e11.
6. Surana V, Dabas A, Khadgawat R, Marwaha RK, Sreenivas V, Ganie MA, Gupta N, Mehan N. Pubertal Onset in Apparently Healthy Indian Boys and Impact of Obesity. *Indian J Endocrinol Metab.* 2017; 21:434-438.
7. Prior M, Stewart J, McEleny K, Dwyer AA, Quinton R. Fertility induction in hypogonadotropic hypogonadal men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2018; 89:712-71.
8. Laron Z, Arad J, Gurewitz R, Grunebaum M, Dickerman Z. Age at First Conscious Ejaculation: A Milestone in Male Puberty. *Helv Paediat 1980; Acta* 35. 13-20.
9. Carlier JG, Steeno OP. Oigarche: The Age at First Ejaculation. *Andrología* 1985;17: 104-106.
10. Garcia-Baltazar J 1994 The reproductive characteristics of adolescents and young adults in Mexico City. *Salud Pública* 1994; 36:125.
11. Ji Cy, Ohsawa S. Onset of the release (spermarche) in Chinese male youth. *Am J Human Biol* 2000; 12:577-587.
12. Vásquez JF. Características del espermograma y determinación de los niveles séricos de gonadotropinas al inicio de la espermatogénesis humana en una población de adolescentes de la ciudad de Barranquilla, Colombia 1999-2000 [tesis doctoral] Bellatera: Universidad Autónoma de Barcelona; 2004, <http://www.tdx.cat/TDX-0701104-170507>
13. Soriano L, Argente J. Desarrollo y pubertad en el ser humano *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2017; 8:4-7.



14. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45: 13-2.
15. Baldwin, BT. The Determination of Sex Maturation in Boys by a Laboratory Method. *J Comp Psychol* 1928;8: 39-43.
16. Richardson DW, Short RV. Time of Onset of Sperm Production in Boys. *J. Biosoc Sci Suppl* 1978; 5:15-25.
17. Hirsch M, Shemesh J, Modan M, Lunenfeld B. Emission of Spermatozoa Age of Onset. *International Journal of Andrology* 1979; 2:289-298.
18. 18) Nielsen CT, Skakkebaek NE, Richardson DW, Darling JA, Hunter WM, Jørgensen M, Nielsen A, Ingerslev O, Keiding N, Müller J. Onset of the Release of Spermatozoa (Spermarche) in Boys in Relation to Age, Testicular Growth, Pubic Hair and Height. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1986; 62: 532-535.
19. Kulin HE, Frontera MA, Demers LM, Bartholomew MJ, Lloyd TA. The Onset of Sperm Production in Pubertal Boys. *Am J Dis Child.* 1989; 143:190-3.
20. Sniffen RC. The Testis, I. The Normal Testis. *Arch Path* 1950, 50, 259
21. Charny WC, Conston AS and Meranze DR. Development of Testis. A Histologic Study from Birth to Maturity with some Notes on Abnormal variation. *Fertil Steril* 1952; 3: 461.
22. Janczewski Z, Bablock L. Semen Characteristics in pubertal boys. IV: Semen quality and the hormonal profile *Archives of andrology* 1985; 15: 219-223.
23. Mori MM, Cedenho AP, Koifman S, Srougi, M. Sperm characteristics in a sample of healthy adolescents in São Paulo, Brazil *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* 2002; 18:525-530.
24. Zenen C. Caracterización biológica de la espermarquia de una población de adolescentes escolarizados asociadas al primer año post oigarquia, 2012. Tesis Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad del Norte, No 108777 Barranquilla, Colombia.
25. Paris E, Menchetti A, De Lazzaro L, Marrocco M, Nuzzo C, Radicioni A. Lo spermogramma nell'adolescenza. *Minerva Pediatr* 1998; 50:30324.
26. Kliesch S, Behre H, Jurgens H, Nieschlag E. Criopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Medical and Pediatric Oncology* 1996; 26:20-27.
27. Vásquez F, Soler C, Camps P, Valverde A, García-Molina A. Spermogram and sperm head morphometry assessed by multivariate cluster analysis results during adolescence (12-18 years) and the effect of varicocele. *Asian J Androl.* 2016;18:824-830.
28. Rey Valzacchi G. Estudio Genético. Introducción a la genómica y aspectos genéticos en la clínica andrológica Capitulo 22 Tratado de Andrología y Medicina sexual. N. Cruz, Editorial Panamericana 2012
29. Wood HM, Elder JS. Cryptorchidism and Testicular Cancer: Separating Fact From Fiction. *The Journal of Urology* 2009;181: 452-461.
30. Chung, JM, Lee, SD. Current Issues in Adolescent Varicocele: Pediatric Urological Perspectives *The World Journal of Men's Health* 2018; 36: 123.
31. Bong GW, Koo HP. The adolescent varicocele: to treat or not to treat. *Urol Clin North Am.* 2004;31: 509-15.

32. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*. 2008; 90:2222-5.
33. Vásquez F, Stambulie E, Ortega C, Pérez T, Sierra M, Vergara J. Impact of obesity on seminal parameters. *Journal of Andrology* 2009 Supplement Vol 30: 48
34. Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Díaz-Gutierrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregón E. Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia*. 2004;36:1-23.
35. Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004; 59: 375-82
36. Bracken MB, Eskenazi B, Sachse K, McSharry JE, Hellenbrand K, Leo-Summers L. Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil Steril*. 1990; 53:315-22.
37. Hassa H, Yildirim A, Can C, Turgut M, Tanir HM, Senses T, Sahin-Mutlu F. Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006; 33:19-22
38. Kesari KK, Agarwal A, Henkel R. Radiations and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16:118.
39. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol*. 2018;16:10-20.

*Revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# ANTICONCEPCIÓN HORMONAL MASCULINA: UNA REALIDAD

Christina Wang<sup>1,2</sup>

Waleed Butt<sup>2</sup>

Hae Seung Lee<sup>2</sup>

Ronald Swerdloff<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Clínicas y Traslacionales. <sup>2</sup> División de Endocrinología, Departamento de Medicina, Instituto Lundquist y Centro Médico Harbor-UCLA.

Autor correspondiente: Christina Wang, MD, Clinical and Translational Science Institute, The Lundquist Institute, 1124 Carson Street, Torrance, CA 90502, USA. Correo electrónico: [wang@lundquist.org](mailto:wang@lundquist.org)

El principio de la anticoncepción masculina hormonal se basa en la administración del esteroide sexual testosterona u otro andrógeno junto con una progestina u otro agente, para suprimir la producción endógena de gonadotropinas, testosterona y la espermatogénesis. La testosterona se ha utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de hombres con hipogonadismo durante más de 70 años y las progestinas son un componente esencial para la anticoncepción femenina hormonal. Este capítulo revisará brevemente la venida era de la anticoncepción masculina hormonal cuando un método puede estar disponible a partir de 2034 o antes, allanando el camino para otros anticonceptivos masculinos no hormonales específicos (Wang, et al., 2016).

## **Métodos anticonceptivos masculinos actuales: retiro, condón y vasectomía**

Existe una necesidad insatisfecha de anticoncepción, las parejas sexualmente activas que no usan ningún método anticonceptivo fueron 12.3 % en 2010, variando del 6.2 % en América del Norte, el 10.4 % en América Latina, el 11.0 % en Asia y el 23.2 % en África (Alkema, et al. 2013). Las necesidades son aún mayores para las adolescentes (15 a 19 años) a nivel mundial: en América Latina, la prevalencia de uso de métodos anticonceptivos modernos fue del 23.7 % y la necesidad de planificación familiar es del 32.4 % en mujeres adolescentes (Kantorová, et al., 2021). No hay estudios comparables en hombres.

Los métodos anticonceptivos masculinos actualmente disponibles incluyen coitus interruptus (retiro), condones y vasectomía. El método de retiro es utilizado por alrededor del 3.1% de los hombres en el mundo. El método requiere el autocontrol de la pareja masculina y tiene una tasa de fracaso del 20%. Debido a esta alta tasa de fracaso inaceptable, se recomienda que se ponga a disposición de la pareja femenina un método alternativo, como la anticoncepción de emergencia (Organización Mundial de la Salud y Escuela de Salud Pública de Johns Hopkins, 2018).

Los preservativos de látex y poliuretano son el método anticonceptivo masculino más utilizado, con una prevalencia de uso del 11.3 % en Latinoamérica, 11.9 % en Norteamérica y 16.7 % en Europa (Ross & Hardee, 2017). Los condones tienen la ventaja de proteger contra la transmisión de ETS y deben ser el método masculino preferido durante los encuentros sexuales casuales. El éxito del uso del condón depende de la habilidad y la experiencia del usuario (Organización Mundial de la Salud y Escuela de Salud Pública de Johns Hopkins, 2018). La tasa

típica de falla del uso de condones es del 13 %, pero cuando se usa correctamente, la tasa de falla del método es solo del 2% (Sundaram, et al., 2017).

La vasectomía se ofrece como un método anticonceptivo permanente y es más adecuada para parejas en una relación estable que han completado su familia o que no desean tener hijos en el futuro. La tasa de fracaso de la vasectomía es inferior al 1%. Aunque la reversión de la vasectomía es posible con cirugía especializada o tecnología de reproducción asistida, la tasa de embarazo en la pareja femenina no está garantizada incluso cuando se restablece la permeabilidad del conducto deferente. La vasectomía es más simple y menos costosa que la esterilización femenina permanente con ligadura de trompas. La vasectomía sin bisturí es un método aceptado que utiliza cirugía mínimamente invasiva con menos tiempo de operación, y se asocia con menos dolor y tasas más bajas de sangrado e infección (Sharlip, et al., 2015). La aceptación de la vasectomía es muy variable en todo el mundo: su prevalencia es más alta en América del Norte y Europa 11.9 % en comparación con el 3.2 % en América Latina y el 0 % en África (Ross & Hardee, 2017). Los nuevos métodos para ocluir los conductos deferentes incluyen la inyección de polímeros de alto peso molecular que forman un hidrogel, "taponos curados en el lugar", que se pueden disolver cuando ya no se requiere anticoncepción (Waller, et al., 2017), pero hasta donde sabemos, los estudios clínicos en hombres aún no han comenzado.

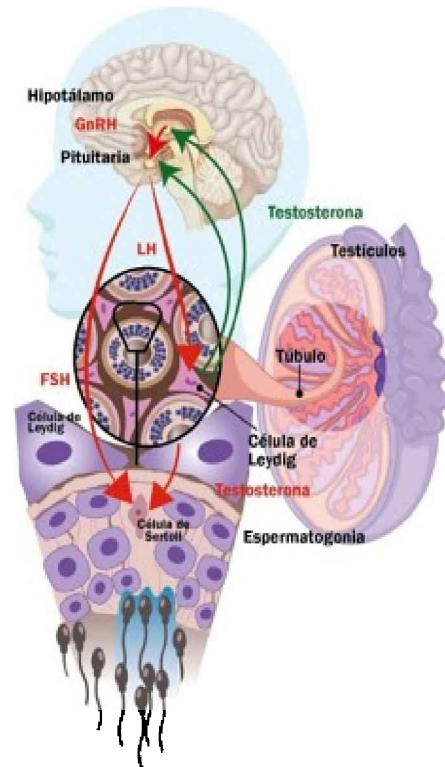
### Los principios de la anticoncepción masculina hormonal

En los hombres, la GnRH hipotalámica (hormona liberadora de gonadotropina) regula la función de los testículos a través de la estimulación de la glándula pituitaria para producir y secretar gonadotropinas, LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona estimulante del folículo) (Fig. 1 panel izquierdo, sólido verde las flechas son estimulantes). LH estimula las células de Leydig para sintetizar y secretar testosterona.

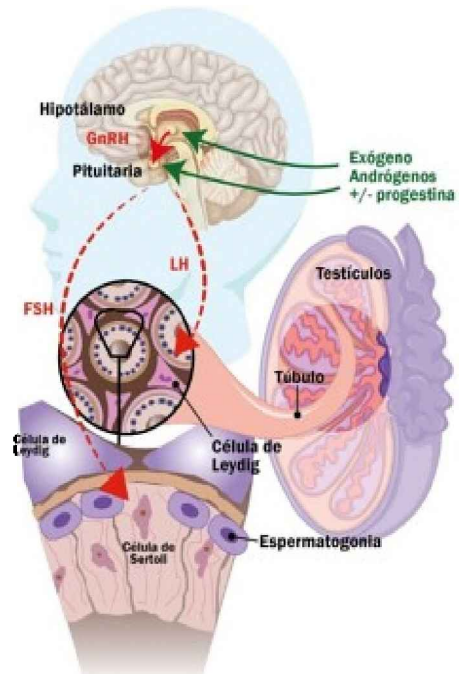
Las concentraciones de testosterona intratesticular son aproximadamente de 25 a 125 veces más altas que la concentración en la circulación periférica. La testosterona en los testículos se difunde hacia los túbulos seminíferos para actuar sobre las células de Sertoli y promover la diferenciación de las espermatogonias en espermatozoides maduros (espermatozoides). La FSH estimula las células de Sertoli para que secreten muchos factores que estimulan la espermatogénesis. La testosterona ejerce una retroalimentación negativa (**Figura 1** panel izquierdo, flechas rojas sólidas) tanto en el hipotálamo como en la glándula pituitaria para regular la producción de LH y FSH para mantener la homeostasis del eje. La anticoncepción hormonal masculina utiliza los mismos principios que la anticoncepción hormonal femenina, donde la administración exógena de agentes anticonceptivos suprime el eje hipotálamo-pituitario-testicular. Los andrógenos exógenos (principalmente testosterona), ya sea solos o en combinación con una progestina, suprimen la producción de GnRH, LH y FSH utilizando el mecanismo de retroalimentación negativa (**Figura 1**, flechas rojas del panel derecho). Los antagonistas de GnRH también suprimen la producción de LH y FSH a nivel pituitario.

La producción reducida de LH da como resultado una supresión marcada de la producción de testosterona por parte de las células de Leydig (**Figura 1**, líneas verdes punteadas del panel derecho) creando una concentración de testosterona muy baja dentro del testículo disponible para las células de Sertoli (observe la ausencia de testosterona en el panel derecho en la **Figura 1**), impidiendo la diferenciación y maduración de espermatogonias a espermatozoides. Al mismo tiempo, la secreción reducida de FSH de la glándula pituitaria colabora con la falta de testosterona intratesticular para inducir una marcada supresión de la espermatogénesis. Los métodos anticonceptivos masculinos hormonales basados en este principio de supresión de gonadotropinas requieren testosterona u otro andrógeno para mantener los niveles séricos de hormonas masculinas en el rango normal masculino adulto para apoyar la función sexual, las características sexuales secundarias y los efectos dependientes de los andrógenos en el receptor masculino. (Thirumalai & Amory, 2021; Yuen, et al., 2020). Los andrógenos/progestágenos administrados exógenamente actúan a través de receptores que no solo se encuentran en los órganos reproductores (epidídimo, vesícula seminal y próstata) sino también en el cerebro, hígado, músculo, tejido adiposo, hueso y células hematopoyéticas produciendo efectos beneficiosos o adversos.

## Función reproductiva masculina normal



## Anticoncepción hormonal masculina



**Figura 1.** Principios de la anticoncepción masculina hormonal. El eje normal hipotálamo-testicular-testicular se representa a la izquierda. Las flechas verdes son estimulantes y las flechas rojas son inhibitorias. El GNRH producido por el hipotálamo estimula la producción y la secreción de LH y FSH por el hipotálamo. LH estimula las células de Leydig para producir testosterona, que actúa en las células SERTOLI dentro de los túbulos seminíferos para regular la espermatogénesis. Los actos FSH también en las células SERTOLI y, junto con la testosterona, inicia la progresión de la espermatogénesis para producir espermatozoides maduros. A la derecha se encuentra la situación inducida por los anticonceptivos hormonales masculinos en los que los andrógenos exógenos y las progestinas suprimen la liberación de la GNRH de las neuronas hipotálamicas y LH y FSH de la pituitaria (flechas verdes punteadas), privando las testículos de testosterona (nota ausencia de la producción de testosterona Forma las células Leydig en el panel derecho), y junto con la disminución de la progresión de la espermatogénesis de la espermatogénesis a los espermatozoides maduros. GnRH = hormona liberadora de gonadotropina; FSH = hormona estimulante del folículo; LH = hormona luteinizante. Adaptado de Thirumalai, A., & Amory, J. K. (2021). Enfoques emergentes a la anticoncepción masculina. *Fertilidad y esterilidad*, 115 (6), 1369-1376.

## La anticoncepción masculina hormonal es eficaz para prevenir el embarazo en ensayos clínicos

Los ensayos de eficacia de los prototipos de anticonceptivos masculinos hormonales proporcionaron evidencia de que los hombres podrían confiar únicamente en este método para la anticoncepción altamente efectiva. En los primeros ensayos de inyecciones semanales de testosterona enantato, los participantes no podían entrar en la fase de eficacia (cuando la pareja utilizaba el fármaco experimental como único método anticonceptivo) hasta que tres concentraciones consecutivas de espermatozoides alcanzaban la azoospermia (ausencia de espermatozoides en la eyaculación) en el primer estudio (Grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre métodos para la regulación de la fertilidad masculina, 1990) y  $\leq 3$  millones/mL en el segundo estudio (Grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre la regulación de la fertilidad masculina, 1996). En la fase de eficacia del segundo estudio, el 77 % de los hombres presentaba azoospermia, el 13 % fluctuó entre oligozoospermia grave ( $\leq 3$  millones/mL) y azoospermia, y el 10 % presentaba oligozoospermia grave constante. No se produjo ningún embarazo cuando los hombres eran azoospermicos; cuatro embarazos se atribuyeron a concentraciones de espermatozoides entre 0.1 y 3 millones/mL. La tasa de fracaso de los anticonceptivos se relacionó con la concentración de espermatozoides (Grupo de Trabajo de la

Organización Mundial de la Salud sobre la Regulación de la Fertilidad Masculina, 1996). Desde este ensayo, los criterios de ingreso para participar en ensayos clínicos de eficacia anticonceptiva se ajustaron al reducir el umbral de concentración de espermatozoides a  $\leq 1$  millón/mL (Aaltonen, et al., 2007).

Posteriormente, grandes ensayos de anticonceptivos masculinos hormonales que utilizaron inyecciones de testosterona undecanoato o implantes de testosterona solos, o en combinación con inyecciones de progestina, demostraron que el uso de la medición de la concentración de espermatozoides de  $\leq 1$  millón/mL como criterio para ingresar la eficacia logró tasas de falla anticonceptiva entre 1.1-1.6 por 100 personas/años (Tabla 1) (Behre, et al., 2016; Gu, et al., 2009; Gu, et al., 2003; McLachlan, et al., 2000; Turner, et al., 2003; World Health Grupo de Trabajo de la Organización sobre Métodos para la Regulación de la Fertilidad Masculina, 1990; Grupo de Trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre la Regulación de la Fertilidad Masculina, 1996). Estas tasas de fracaso son comparables a las tasas observadas para los anticonceptivos hormonales contemporáneos para mujeres (Sundaram, et al., 2017). Ninguno de estos estudios de eficacia clínica informó sobre la motilidad o la morfología de los espermatozoides dada la marcada supresión concomitante de estos parámetros espermáticos cuando las concentraciones de espermatozoides se suprimieron a  $\leq 1.0$  millones/ml (Gonzalo, et al., 2002; Ilani, et al., 2012; Kamischke, et al., 2002).

Table 1. Hormonal Male Contraceptive Efficacy Clinical Trials

Agents	Sperm Concentration Threshold million/ml	Number Enrolled	Number Reaching Threshold	Number Entering Efficacy	% Azospermia During efficacy	Pregnancies/ Failure Rate (Pearl Index and 95% CI)	Study Reference
TE 200 mg/week	Azoo-spermia	271	157 (70%)	157	100%	1 0.8 (0.0-4.5)	WHO 1990
TE200 mg/week	$\leq 3$ (reduced from $\leq 5$ )	399	349 (97.8%)	268	95% Asian 68% Others	4 1.4 (0.4-3.7)	WHO 1996
T implants 800 or 1200 mg/4-6 months +DMPA 300 mg/3months	$\leq 1$	55	53 (94%)	51	96%	0 0 (0-8)	Turner et al 2003
TU 1000 mg loading 500mg/month	$\leq 3$	308	299 (97.1%)	296	98%	1 2.3 (0.5-4.2)	Gu et al 2003
TU 1000 mg loading 500 mg/month	$\leq 1$	1045	855 (95.2%)	855	100%	9 1.1 (0.4-1.8)	Gu et al 2009
TU 1000mg IM and Norethisterone enanthate IM 200mg /8 weeks	$\leq 1$	320	274 (95.9%)	266	-	4 1.57 (0.59-4.14)	Behre et al 2016
Testosterone 62 to 75 mg + Nestorone 8mg gel transdermal daily	$\leq 1$	316 ongoing	ongoing	188 ongoing	98% ongoing	ongoing	unpublished

Modified from Wang, C, Festin, MP, Swerdloff, R (2016) Male Hormonal Contraception: Where are We Going? Curr Obstet Gynecol Rep 5: 38-47.

## Factores que afectan la espermatogénesis y la supresión de la producción de esperma

En los primeros estudios se observó que la supresión de la espermatogénesis a la azospermia ocurría en el 96 % de los hombres asiáticos y solo en el 68 % de los hombres no asiáticos (Grupo de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre métodos para la regulación de la fertilidad masculina, 1990). Sin embargo, la supresión de la concentración de espermatozoides a oligozoospermia severa ( $\leq 3$  o 1 millón/mL) no fue diferente entre los grupos étnico-raciales (*World Health Organization Task Force on the Regulation of Male Fertility*, 1996). Se han informado diferencias iniciales en la histomorfología testicular, el metabolismo de la testosterona y la capacidad de respuesta de la glándula pituitaria a la administración de testosterona exógena entre hombres blancos y asiáticos orientales, pero poco se sabe si esto contribuye significativamente a los diversos grados de supresión de la espermatogénesis en respuesta a la terapia con testosterona exógena. Ilani, et al., 2011; Wang, et al., 1998).

En un análisis retrospectivo de 1756 hombres que participaron en ensayos clínicos de anticonceptivos masculinos entre 1996 y 2006, la coadministración de progestina con testosterona aumentó tanto la tasa como el alcance de la supresión de la espermatogénesis. La adición de una progestina a la testosterona fue el factor más importante para inducir una supresión más completa de la producción de esperma. Este estudio también confirmó que los hombres blancos suprimieron

la espermatogénesis en menor medida que los hombres asiáticos. La edad más joven, la concentración de espermatozoides de referencia más baja y la concentración de testosterona más baja se asociaron con una supresión más rápida (Liu, et al., 2008). Por lo tanto, optimizar la combinación de progestágenos con andrógenos debería ser suficiente para suprimir la espermatogénesis independientemente de la raza y el origen étnico (Wang, et al., 2016). Este es el objetivo actual del desarrollo de anticonceptivos masculinos hormonales.

### **La anticoncepción masculina hormonal es reversible**

En un análisis integrado de variable múltiple de datos individuales de más de 1500 participantes en 30 estudios anticonceptivos masculinos hormonales entre 1990 y 2005, mostramos que después de la administración de Androgen o Androgen Plus PROGESTIN, la probabilidad de recuperación a la concentración de espermatozoides  $\geq 20$  millones / ml fue 67% a los 6 meses y 90% dentro de los 12 meses y 100% dentro de los 24 meses. La recuperación más rápida ocurrió con una duración más corta de tratamiento, preparaciones de testosterona de actuación corta, edad, hombres de origen asiático, mayor concentración de espermatozoides en línea de base, supresión más rápida de la espermatogénesis, y menor es el suero de referencia. Este estudio concluye que la anticoncepción hormonal masculina es totalmente reversible (Liu, et al., 2006).

En los hombres hipogonadales infértiles donde la espermatogénesis puede ser intrínsecamente defectuosa, una revisión sugirió que la terapia exógena de testosterona puede causar una infertilidad prolongada y que la recuperación de la espermatogénesis puede ser acelerada por la administración de antiestrógenos o gonadotropinas coriónicas humanas (Oxpander, et al., 2016). Sin embargo, otro estudio mostró que cuando los hombres sanos con parámetros de espermatozoides subnormales recibieron cuatro inyecciones de un reconocimiento de testosterona, mostraron la misma capacidad de respuesta y recuperación de la espermatogénesis como voluntarios sanos con parámetros normales de espermatozoides (Nieschlag, et al., 2011). El elemento clave para estudiar la recuperación de la espermatogénesis después de la interrupción de la anticoncepción masculina hormonal es garantizar que los hombres continúen regresando para los análisis de semen, ya que se espera la recuperación completa, pero el tiempo de recuperación varía.

### **Andrógenos y progestinas para la anticoncepción masculina hormonal**

Cuando los regímenes de testosterona u otro andrógeno solo fueron utilizados inicialmente para ensayos clínicos anticonceptivos masculinos hormonales, se reconoció que los andrógenos solo pueden suprimir a los hombres con una concentración de esperma muy baja compatible con la eficacia anticonceptiva ( $\leq 1$  millones / ml) en más del 95% de hombres asiáticos, pero la supresión fue menor en los hombres blancos (fuerza de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre los Métodos para la Regulación de la Fertilidad Masculina, 1990; Organización Mundial de la Salud en la regulación de la fertilidad masculina, 1996). Los antagonistas de GnRH con andrógenos son tan efectivos, pero el costo y las inyecciones subcutáneas frecuentes excluyen el desarrollo adicional hasta que estén disponibles agentes de acción más prolongada o agentes GnRH orales (Bagatell, et al., 1995; Long, et al., 2021; Swerdloff, et al., 1998).

La búsqueda actual de anticoncepción hormonal involucra la combinación de andrógenos y progestinas. La Tabla 2 resume las preparaciones combinadas de andrógenos y progestinas que se han probado en ensayos clínicos (Merigiola, et al., 2003; Nieschlag, et al., 2003; Wang & Swerdloff, 2004). Cuando se administró la combinación de pellets de testosterona con inyecciones de acetato de depot-medroxiprogesterona (DMPA) a 55 hombres, el 94% de ellos ingresó a la eficacia sin que el embarazo se informó en el socio, y la recuperación mediana solo tomó cinco meses (Turner, et al., 2003). El otro ensayo clínico multinacional, multicéntrico reclutó a 320 parejas donde los participantes masculinos se administraron testosterona undecanoato e inyecciones de noretisterona cada 2 meses. La concentración de espermatozoides se suprimió a  $\leq 1$  millón / ml en el 95.9% de los hombres que entraron en la fase de eficacia. Se produjeron cuatro embarazos en 266 parejas que dan una tasa de falla de 1.57 por cada 100 usuarios continuos comparables a los métodos anticonceptivos hormonales modernos (Behre, et al., 2016). Los participantes masculinos se recuperaron a la concentración de espermatozoides dentro del rango de referencia de adultos dentro de las 52 semanas. Los eventos adversos comunes fueron el acné, el dolor en la inyección, el aumento de la libido y los cambios de estado de ánimo.

Este estudio fue detenido prematuramente por un Comité Asesor Externo debido a un aumento de los eventos de estado de ánimo adversos que fueron leves a moderados y ocurrieron de manera desigual entre los centros. Sin embargo, los participantes del estudio encontraron el método aceptable, y los investigadores concluyeron que la eficacia anticonceptiva era buena (Behre, et al., 2016).

**Table 2. Testosterone + Progestins used in Hormonal Male Contraception Clinical Trials**

Androgens	Progestin
Testosterone patch	Levonorgestrel Implants
Testosterone gel	DMPA injections
	Nestorone (Segesterone) Gel *
Testosterone injections: Enanthate, Decanoate, Undecanoate	DMPA injections
	Oral Levonorgestrel, desogestrel
	Levonorgestrel implants
	Etonogestrel implants
	Norethisterone injections
Testosterone Implants	DMPA Injections
New Modified androgens Dimethandrolone undecanoate* (DMAU); 11beta-Methyl-19-Nortestosterone-17beta- Dodecylcarbonate (11β-MNTDC) * oral and injections 7 alpha methyl-19 nor-testosterone (MENT) I implants	New levonorgestrel injection Levonorgestrel butanoate
*Currently utilized in clinical trials	

El Instituto Nacional de Salud Infantil de Eunice Shriver y el Desarrollo Humano (NICHD) respaldó los centros de redes de ensayos clínicos anticonceptivos (CCTN). El CCTN realizó pruebas de concepto y estudios de fase temprana que demostraron que la testosterona transdérmica y el gel de nestorona cuando se aplican diariamente a la piel por los hombres, dieron como resultado una supresión persistente del eje hipotalámico-hipofisario-testicular (Mahabadi, et al., 2009) y la supresión marcada de espermatogénesis en aproximadamente el 90% de los hombres que aplican el gel durante 6 meses (ILANI, et al., 2012). Dos estudios puente examinaron la farmacocinética y la farmacodinámica (Anawalt, et al., 2019) y la prevención de la exposición secundaria del gel combinado a la pareja femenina (Yuen, et al., 2019). El CCTN está realizando un estudio de eficacia anticonceptiva en 15 centros en 4 continentes y los resultados iniciales son muy prometedores con el 98% de los hombres con azoospermia persistente cuando alcanzan los 12 meses de tratamiento (Tabla 1) (Long, et al., 2021).

Además, CCTN está completando estudios de fase 1 sobre dos nuevos andrógenos que no solo se unen al receptor de andrógenos sino también al receptor de progesterona. Estos compuestos, Dimetandrolone Undecanoate (DMAU) y 11beta-metil-19-Nortestosterona-17BETA-DodecylLcarbonato (11β-MNTDC) tienen acciones de andrógeno y progesterona y esta propiedad permitiría el uso de un compuesto con dos acciones diferentes. (ATTTI, ET al., 2011; attdi, et al., 2006). Tienen una buena biodisponibilidad oral y se están desarrollando como pastillas e inyecciones para la anticoncepción masculina. Los estudios a corto plazo de 28 días confirmaron que la DMAU y el 11β-MNTDC se convirtieron rápidamente a los medicamentos activos, DMA y 11β-MNT. Estos nuevos andrógenos eran efectivos para suprimir tanto LH como FSH con los efectos anticipados de los andrógenos (Wu, et al., 2019; Yuen, et al., 2020). Se necesitan estudios a más largo plazo para demostrar la supresión de la espermatogénesis y la producción de espermatozoides con estos nuevos andrógenos. Al mismo tiempo, estos dos esteroides administrados como inyecciones intramusculares están en ensayos clínicos de Fase 1.



## **Seguridad y tolerabilidad de la anticoncepción masculina hormonal**

Los agentes anticonceptivos masculinos hormonales probados hasta el presente han sido muy seguros y bien tolerados por los participantes del ensayo (Wu, et al., 1996). La testosterona se ha utilizado desde la década de 1950 como reemplazo para los hombres con deficiencia de testosterona. Por lo tanto, los posibles eventos adversos son muy conocidos (Bhasin, et al., 2018). Los efectos adversos comunes pero leves incluyen el acné, la piel grasa, los cambios de libido, los cambios de humor y los sudores nocturnos. El uso de testosterona o ésteres de testosterona no produce cambios en la función hepática o renal. También es importante tener en cuenta el modo de administración, ya que la testosterona oral puede resultar en una mayor supresión del colesterol de lipoproteínas de alta densidad y la globulina transportadora de hormonas sexuales que las inyecciones parenterales y las aplicaciones transdérmicas de gel. Los andrógenos no deben administrarse a hombres con hiperplasia prostática benigna sintomática y cáncer de próstata. Los andrógenos no causan enfermedades de la próstata, pero pueden aumentar los síntomas de obstrucción urinaria inferior y agravar el cáncer de próstata.

Se desconocen los posibles efectos a largo plazo sobre la progresión del cáncer de próstata localizado a una enfermedad más generalizada o sobre el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular y se esperan los resultados de un gran ensayo controlado con placebo. Cabe señalar que la anticoncepción masculina hormonal está dirigida a hombres que son mucho más jóvenes que hombres mayores con enfermedad cardiovascular o de próstata. Las concentraciones séricas de testosterona en los ensayos de anticonceptivos hormonales masculinos se mantienen en el rango de referencia de hombres adultos, de modo que cualquier posible evento adverso debe ser mínimo.

La acción y los efectos de las progestinas en el varón no están claros. Los efectos adversos conocidos son datos en su mayoría de estudios de anticoncepción hormonal femenina. Esto puede incluir aumento de peso, cambios de humor, sudores nocturnos y posibles cambios en el metabolismo de la glucosa y los lípidos según la progestina que se haya utilizado (Ilani, et al., 2012; Kamischke, et al., 2001; Mammers, et al., 2008). Una vez que un producto esté disponible para los hombres, el estudio epidemiológico a largo plazo evaluaría estos posibles efectos adversos de las combinaciones de andrógenos y progestágenos en hombres sanos más jóvenes.

## **Aceptación de la anticoncepción masculina hormonal de los hombres**

La aceptabilidad de la anticoncepción masculina hormonal es generalmente favorable en los hombres que participaron en ensayos clínicos. En un estudio de aceptabilidad cuidadosamente diseñado de inyecciones mensuales de testosterona undecanoato en hombres chinos sanos, los participantes en el ensayo encontraron que el método era aceptable pero informaron que las visitas mensuales con inyecciones y análisis de semen eran inconvenientes (Zhang, et al., 2006).

En el estudio multinacional que usó inyecciones de testosterona undecanoato con enantato de noretisterona cada dos meses para prevenir el embarazo en la pareja femenina, el 88 % de las parejas informaron que usarían este método y el 82% estaban satisfechos con el método (Behre, et al., 2016). Los participantes en el estudio de fase dos inicial del gel combinado de noretisterona y testosterona estaban satisfechos con el gel, el 90 % encontró que el gel era fácil de usar y el 50 % usaría el gel si estuviera disponible y recomendaría el método a otros. (Anawalt, et al., 2019; Roth, et al., 2014). En nuestros estudios más recientes sobre los andrógenos orales con actividad de progestina, el 75 % de las participantes estaban satisfechas con la píldora, el 90 % recomendaría el método a otras personas y el 63 % pagaría por este método anticonceptivo cuando estuviera disponible (Nguyen, et al. 2020; Nguyen, et al., 2021).

Los participantes del estudio en los ensayos clínicos pueden no representar a la población general, aunque aquellos inscritos en el estudio de prevención del embarazo pueden reflejar la actitud y el comportamiento de los hombres en edad reproductiva que están interesados en usar métodos anticonceptivos masculinos. Un estudio multinacional que utilizó cuestionarios o entrevistas estructuradas en aproximadamente 1800 hombres en Edimburgo, Ciudad del Cabo, Shanghái y Hong Kong concluyó que entre el 44 y el 83 % de los hombres usaría una píldora anticonceptiva. Los hombres preferían las píldoras diarias a las tres inyecciones mensuales, mientras que los implantes eran menos aceptables (Martin, et al., 2000). Del 71 al 90 % de las mujeres en las mismas cuatro ciudades pensaron que una píldora masculina era una buena idea y solo el 2 % de las mujeres no confiaría en que su pareja usaría el método masculino constantemente (Glasier, et al., 2000). Otra encuesta de estudio de 9000 hombres de nueve

países en cuatro continentes utilizando una entrevista estructurada mostró que la decisión de usar qué método anticonceptivo se tomó conjuntamente tanto por el hombre como por la mujer en el 54% al 82% de las parejas, y más del 55% de los hombres estaban dispuestos a usar un nuevo método anticonceptivo. Los hombres de América del Norte y Europa prefirieron una píldora oral, mientras que los implantes fueron los menos preferidos (Heinemann, et al., 2005). En África, los hombres de Nigeria prefieren los preservativos y en Zimbabue, alrededor del 32 % consideraría utilizar un nuevo método anticonceptivo masculino (Mbizvo & Adamchak, 1992; Onwujekwe, et al., 2013).

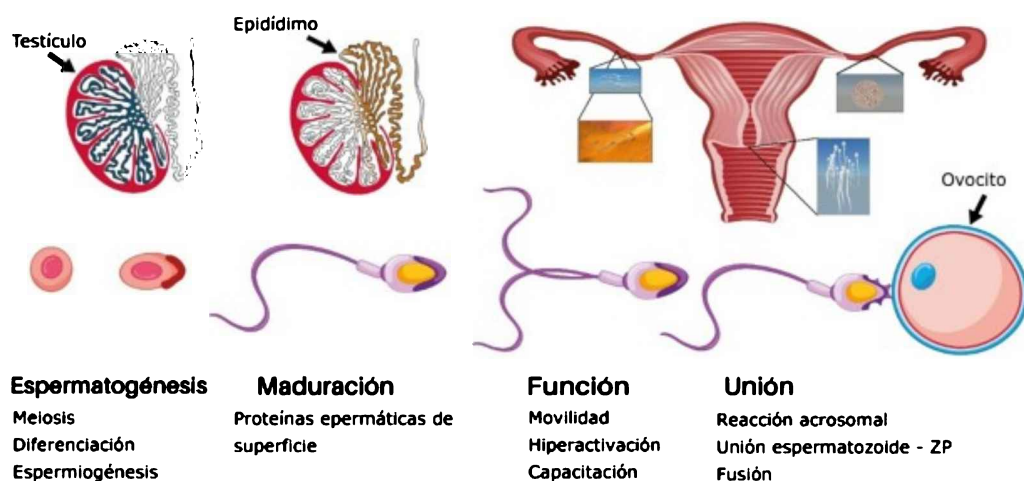
Estas encuestas de población se realizaron hace más de 15 años y la equidad de género ha cambiado notablemente en los últimos años. Las encuestas basadas en la población, tanto en regiones del mundo desarrolladas como en vías de desarrollo y con escasos recursos, deben realizarse con el uso de enfoques más relevantes temporalmente, como las redes sociales, para redefinir la aceptabilidad de la anticoncepción masculina tanto en hombres como en mujeres.

### **Futuro de la anticoncepción masculina hormonal**

Actualmente hay una falta de apoyo financiero de las compañías farmacéuticas para el desarrollo de anticonceptivos. Las razones de la vacilación de las compañías farmacéuticas para prestar apoyo pueden estar relacionadas con 1). Incertidumbre relacionada con la ruta de aprobación regulatoria de un producto anticonceptivo masculino; 2). Incertidumbre percibida en la confianza de la pareja femenina del hombre que utiliza métodos anticonceptivos; 3). Cuestión de quién será el proveedor de atención médica de la anticoncepción masculina; 4). Posible responsabilidad por falla de los métodos; y 5). Preguntas sobre los efectos a largo plazo del método. Los nuevos métodos anticonceptivos dirigidos a hombres han ganado apoyo a través de las redes sociales y se deben ampliar los esfuerzos para proporcionar información sobre todos los nuevos métodos anticonceptivos masculinos. Los datos preliminares sobre los datos del gel transdérmico combinado de nesterona y testosterona, así como otros compuestos nuevos, pueden reavivar el interés de las compañías farmacéuticas. Es muy probable que dentro de los próximos 10 años, la combinación de nesterona y testosterona se haya sometido al ensayo clínico de fase 3 necesario que conduzca a la aprobación de este nuevo anticonceptivo masculino controlado por el usuario, reversible y seguro. Se necesitan estudios de panorama para preparar el lanzamiento del producto. Una vez que el producto esté disponible y sea utilizado por hombres, los estudios epidemiológicos posteriores a la comercialización deben garantizar la seguridad a largo plazo del producto en hombres jóvenes sanos. El desarrollo continuo de inyecciones de andrógenos y progestágenos combinados y preparaciones orales seguirá el ejemplo del primer producto aprobado para la anticoncepción masculina reversible.

Los métodos masculinos hormonales allanarán el camino para los enfoques específicos de los métodos no hormonales (**Figura 2**). Los objetivos en los testículos incluyen los procesos únicos de meiosis, diferenciación de espermatozoides y espermiación. Los objetivos potenciales en el epidídimo se encuentran en proteínas específicas de la superficie del espermatozoides que regulan la maduración y adquisición de motilidad de los espermatozoides. El desarrollo de la motilidad hiperactivada de los espermatozoides, la capacitación, la reacción del acrosoma y la unión de los espermatozoides al ovocito se producen en el aparato reproductor femenino y pueden desarrollarse como anticonceptivos combinados masculinos y femeninos. El proceso de desarrollo incluye la identificación del objetivo seguido de experimentos de prueba de concepto para demostrar que la inhibición o eliminación de un objetivo específico da como resultado la infertilidad. Los compuestos farmacológicos que inhiben estos objetivos se desarrollan mediante una pantalla de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos o mediante estudios de estructura y actividad del objetivo (Gottwald, et al., 2006; Noman, et al., 2020; O'Rand, et al., 2016; Salicioni, et al., 2020; Wisniewski & Georg, 2020). Estos nuevos compuestos deben someterse a toxicología preclínica, antes de que puedan comenzar los estudios de seguridad clínica, tolerabilidad y farmacocinética en hombres. Los candidatos a anticonceptivos masculinos no hormonales no han llegado a los ensayos clínicos.

## Blancos Específicos para la Anticoncepción Masculina



**Figura 2.** Blancos potenciales para la anticoncepción masculina. Blancos potenciales para la anticoncepción masculina durante la espermatogénesis, la maduración del espermatozoide en el epidídimo, la perturbación de la función de espermatozoides en el tracto reproductivo femenino y la interferencia con la unión del espermatozoide al ovocítico. Adaptado de Gottwald, U., Davies, B., Fritsch, M., & Habenicht, U. F. (2006). Nuevos enfoques para el control de la fertilidad masculina: el HE6 como ejemplo de un objetivo putativo. *Endocrinología molecular y celular*, 250 (1-2), 49-57.

Apoiado por: the Contraceptive Clinical Trials Network NIH Contract HHSN275201300024I Task Order HHSN27500007 and HHSN275200403369I Task Order HHSN275201000080U, and P50 HD098593, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), and UCLA CTSI Grant UL1TR001881 from the National Center for Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health, Bethesda, USA.

### Referencias

1. Aaltonen P, Amory J K, Anderson R A, Behre H M, Bialy G, Blithe D, Bone W, Bremner W J, Colvard D, Cooper T G, Elliesen J, Gabelnick H L, Gu Y Q, Handelsman D J, Johansson E A, Kersemaekers W, Liu P, MacKay T, Matlin S, Mbizvo M, McLachlan R I, Merigiola M C, Mletzko S, Mommers E, Muermans H, Nieschlag E, Odland V, Page S T, Radlmaier A, Sitruk-Ware R, Swerdloff R, Wang C, Wu F & Zitzmann M. (2007) 10th Summit Meeting consensus: recommendations for regulatory approval for hormonal male contraception. *J. Androl.* 28, 362-363.
2. Alkema L, Kantorova V, Menozzi C & Biddlecom A. (2013) National, regional, and global rates and trends in contraceptive prevalence and unmet need for family planning between 1990 and 2015: a systematic and comprehensive analysis. *Lancet* 381, 1642-1652.
3. Anawalt B D, Roth M Y, Ceponis J, Surampudi V, Amory J K, Swerdloff R S, Liu P Y, Dart C, Bremner W J, Sitruk-Ware R, Kumar N, Blithe D L, Page S T & Wang C. (2019) Combined norethisterone-testosterone gel suppresses serum gonadotropins to concentrations associated with effective hormonal contraception in men. *Andrology* 7, 878-887.
4. Attardi B J, Engbring J A, Gropp D & Hild S A. (2011) Development of dimethandrolone 17beta-undecanoate (DMAU) as an oral male hormonal contraceptive: induction of infertility and recovery of fertility in adult male rabbits. *J. Androl.* 32, 530-540.

5. Attardi B J, Hild S A & Reel J R. (2006) Dimethandrolone undecanoate: a new potent orally active androgen with progestational activity. *Endocrinology* 147, 3016-3026.
6. Bagatell C J, Rivier J E & Bremner W J. (1995) Dose effects of the gonadotropin-releasing hormone antagonist, Nal-Glu, combined with testosterone enanthate on gonadotropin levels in normal men. *Ferti Steril* 64, 139-145.
7. Behre H M, Zitzmann M, Anderson R A, Handelsman D J, Lestari S W, McLachlan R I, Meriggiola M C, Misro M M, Noe G, Wu F C, Festin M P, Habib N A, Vogelsong K M, Callahan M M, Linton K A & Colvard D S. (2016) Efficacy and Safety of an Injectable Combination Hormonal Contraceptive for Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, jc20162141.
8. Bhasin S, Brito J P, Cunningham G R, Hayes F J, Hodis H N, Matsumoto A M, Snyder P J, Swerdloff R S, Wu F C & Yialamas M A. (2018) Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
9. Glasier A F, Anakwe R, Everington D, Martin C W, van der Spuy Z, Cheng L, Ho P C & Anderson R A. (2000) Would women trust their partners to use a male pill? *Hum. Reprod.* 15, 646-649.
10. Gonzalo I T, Swerdloff R S, Nelson A L, Clevenger B, Garcia R, Berman N & Wang C. (2002) Levonorgestrel implants (Norplant II) for male contraception clinical trials: combination with transdermal and injectable testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3562-3572.
11. Gottwald U, Davies B, Fritsch M & Habenicht U F. (2006) New approaches for male fertility control: HE6 as an example of a putative target. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 49-57.
12. Gu Y, Liang X, Wu W, Liu M, Song S, Cheng L, Bo L, Xiong C, Wang X, Liu X, Peng L & Yao K. (2009) Multicenter contraceptive efficacy trial of injectable testosterone undecanoate in Chinese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1910-1915.
13. Gu Y Q, Wang X H, Xu D, Peng L, Cheng L F, Huang M K, Huang Z J & Zhang G Y. (2003) A multicenter contraceptive efficacy study of injectable testosterone undecanoate in healthy Chinese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 562-568.
14. Heinemann K, Saad F, Wiesemes M & Heinemann L A. (2005) Expectations toward a novel male fertility control method and potential user types: results of a multinational survey. *J. Androl.* 26, 155-162.
15. Ilani N, Liu P Y, Swerdloff R S & Wang C. (2011) Does ethnicity matter in male hormonal contraceptive efficacy? *Asian J Androl.*
16. Ilani N, Roth M Y, Amory J K, Swerdloff R S, Dart C, Page S T, Bremner W J, Sitruk-Ware R, Kumar N, Blithe D L & Wang C. (2012) A new combination of testosterone and norethisterone transdermal gels for male hormonal contraception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 3476-3486.
17. Kamischke A, Heuermann T, Kruger K, von Eckardstein S, Schellschmidt I, Rubig A & Nieschlag E. (2002) An effective hormonal male contraceptive using testosterone undecanoate with oral or injectable norethisterone preparations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 530-539.
18. Kamischke A, Venherm S, Ploger D, von Eckardstein S & Nieschlag E. (2001) Intramuscular testosterone undecanoate and norethisterone enanthate in a clinical trial for male contraception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 303-309.
19. Kantorová V, Wheldon M C, Dasgupta A N Z, Ueffing P & Castanheira H C. (2021) Contraceptive use and needs among adolescent women aged 15-19: Regional and global estimates and projections from 1990 to 2030 from a Bayesian hierarchical modelling study. *PLoS One* 16, e0247479.

20. Liu P Y, Swerdloff R S, Anawalt B D, Anderson R A, Bremner W J, Elliesen J, Gu Y Q, Kersemaekers W M, McLachlan R I, Meriggiola M C, Nieschlag E, Sitruk-Ware R, Vogelsong K, Wang X H, Wu F C, Zitzmann M, Handelsman D J & Wang C. (2008) Determinants of the rate and extent of spermatogenic suppression during hormonal male contraception: An integrated analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1774-1783.
21. Liu P Y, Swerdloff R S, Christenson P D, Handelsman D J & Wang C. (2006) Rate, extent, and modifiers of spermatogenic recovery after hormonal male contraception: an integrated analysis. *Lancet* 367, 1412-1420.
22. Long J E, Lee M S & Blithe D L. (2021) Update on novel hormonal and non-hormonal male contraceptive development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
23. Mahabadi V, Amory J K, Swerdloff R S, Bremner W J, Page S T, Sitruk-Ware R, Christensen P D, Kumar N, Tsong Y Y, Blithe D & Wang C. (2009) Combined transdermal testosterone gel and the progestin norethisterone suppresses serum gonadotropins in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2313-2320.
24. Martin C W, Anderson R A, Cheng L, Ho P C, van der Spuy Z, Smith K B, Glasier A F, Everington D & Baird D T. (2000) Potential impact of hormonal male contraception: cross-cultural implications for development of novel preparations. *Hum. Reprod.* 15, 637-645.
25. Mbizvo M T & Adamchak D J. (1992) Male fertility regulation: a study on acceptance among men in Zimbabwe. *Cent. Afr. J. Med.* 38, 52-57.
26. McLachlan R I, McDonald J, Rushford D, Robertson D M, Garrett C & Baker H W. (2000) Efficacy and acceptability of testosterone implants, alone or in combination with a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, for male hormonal contraception. *Contraception* 62, 73-78.
27. Meriggiola M C, Farley T M & Mbizvo M T. (2003) A review of androgen-progestin regimens for male contraception. *J. Androl.* 24, 466-483.
28. Mommers E, Kersemaekers W M, Elliesen J, Kepers M, Apter D, Behre H M, Beynon J, Bouloux P M, Costantino A, Gerbershagen H P, Gronlund L, Heger-Mahn D, Huhtaniemi I, Koldewijn E L, Lange C, Lindenberg S, Meriggiola M C, Meuleman E, Mulders P F, Nieschlag E, Perheentupa A, Solomon A, Vaisala L, Wu F C & Zitzmann M. (2008) Male hormonal contraception: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 2572-2580.
29. Nguyen B T, Farrant M T, Anawalt B D, Yuen F, Thirumalai A, Amory J K, Swerdloff R S, Bremner W J, Liu P Y, Blithe D L, Page S T & Wang C. (2020) Acceptability of oral dimethandrolone undecanoate in a 28-day placebo-controlled trial of a hormonal male contraceptive prototype. *Contraception*.
30. Nguyen B T, Yuen F, Farrant M, Thirumalai A, Fernando F, Amory J K, Swerdloff R S, Anawalt B D, Blithe D L, Long J E, Liu P Y, Page S T & Wang C. (2021) Acceptability of the oral hormonal male contraceptive prototype, 11 $\beta$ -Methyl-19-nortestosterone dodecylcarbonate (11 $\beta$ -MNTDC), in a 28-day placebo-controlled trial. *Contraception*.
31. Nieschlag E, Vorona E, Wenk M, Hemker A K, Kamischke A & Zitzmann M. (2011) Hormonal male contraception in men with normal and subnormal semen parameters. *Int. J. Androl.* 34, 556-567.
32. Nieschlag E, Zitzmann M & Kamischke A. (2003) Use of progestins in male contraception. *Steroids* 68, 965-972.

33. Noman M A A, Kyzer J L, Chung S S W, Wolgemuth D J & Georg G I. (2020) Retinoic acid receptor antagonists for male contraception: current status†. *Biol. Reprod.* 103, 390-399.
34. O'Rand M G, Silva E J & Hamil K G. (2016) Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. *Pharmacol. Ther.* 157, 105-111.
35. Ohlander S J, Lindgren M C & Lipshultz L I. (2016) Testosterone and male infertility. *Urol. Clin. North Am.* 43, 195-202.
36. Onwujekwe O E, Enemuoh J C, Ogbonna C, Mbachu C, Uzochukwu B S, Lawson A & Ndyanabangi B. (2013) Are modern contraceptives acceptable to people and where do they source them from across Nigeria? *BMC international health and human rights* 13, 7.
37. Ross J & Hardee K. (2017) Use of male methods of contraception worldwide. *J. Biosoc. Sci.* 49, 648-663.
38. Roth M Y, Shih G, Ilani N, Wang C, Page S T, Bremner W J, Swerdloff R S, Sitruk-Ware R, Bliithe D L & Amory J K. (2014) Acceptability of a transdermal gel-based male hormonal contraceptive in a randomized controlled trial. *Contraception* 90, 407-412.
39. Salicioni A M, Gervasi M G, Sosnik J, Tourzani D A, Nayyab S, Caraballo D A & Visconti P E. (2020) Testis-specific serine kinase protein family in male fertility and as targets for non-hormonal male contraception†. *Biol. Reprod.* 103, 264-274.
40. Sharlip I M, Belker A M, Honig S, Labrecque M, Marmar J L, Ross L S, Sandlow J I & Sokal D C. (2015) AUA Clinical Guideline: Vasectomy. [https://www.auanet.org/guidelines/vasectomy-\(2012-reviewed-for-currency-2015\)](https://www.auanet.org/guidelines/vasectomy-(2012-reviewed-for-currency-2015)).
41. Sundaram A, Vaughan B, Kost K, Bankole A, Finer L, Singh S & Trussell J. (2017) Contraceptive Failure in the United States: Estimates from the 2006-2010 National Survey of Family Growth. *Perspect Sex Reprod Health* 49, 7-16.
42. Swerdloff R S, Bagatell C J, Wang C, Anawalt B D, Berman N, Steiner B & Bremner W J. (1998) Suppression of spermatogenesis in man induced by Nal-Glu gonadotropin releasing hormone antagonist and testosterone enanthate (TE) is maintained by TE alone. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 83, 3527-3533.
43. Thirumalai A & Amory J K. (2021) Emerging approaches to male contraception. *Fertil. Steril.* 115, 1369-1376.
44. Turner L, Conway A J, Jimenez M, Liu P Y, Forbes E, McLachlan R I & Handelsman D J. (2003) Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4659-4667.
45. Waller D, Bolick D, Lissner E, Premanandan C & Gamerman G. (2017) Reversibility of Vasalgel™ male contraceptive in a rabbit model. *Basic Clin Androl* 27, 8.
46. Wang C, Berman N G, Veldhuis J D, Der T, McDonald V, Steiner B & Swerdloff R S. (1998) Graded testosterone infusions distinguish gonadotropin negative-feedback responsiveness in Asian and white men--a Clinical Research Center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 870-876.
47. Wang C, Festin M P & Swerdloff R S. (2016) Male Hormonal Contraception: Where Are We Now? *Current obstetrics and gynecology reports* 5, 38-47.
48. Wang C, Sitruk-Ware R & Serfaty D. (2016) It is time for new male contraceptives! *Andrology* 4, 773-775.

49. Wang C & Swerdloff R S. (2004) Male hormonal contraception. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, S60-S68.
50. Wisniewski A & Georg G I. (2020) BET proteins: Investigating BRDT as a potential target for male contraception. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30, 126958.
51. World Health Organization & Johns Hopkins School of Public Health. (2018) Family Planning: A global Handbook for Providers. <https://www.fphandbook.org/>.
52. World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. (1990) Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men. World Health Organization Task Force on methods for the regulation of male fertility. *Lancet* 336, 955-959.
53. World Health Organization Task Force on the Regulation of Male Fertility. (1996) Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil. Steril.* 65, 821-829.
54. Wu F C, Farley T M, Peregoudov A & Waites G M. (1996) Effects of testosterone enanthate in normal men: experience from a multicenter contraceptive efficacy study. World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. *Ferti Steril* 65, 626-636.
55. Wu S, Yuen F, Swerdloff R S, Pak Y, Thirumalai A, Liu P Y, Amory J K, Bai F, Hull L, Blithe D L, Anawalt B D, Parman T, Kim K, Lee M S, Bremner W J, Page S T & Wang C. (2019) Safety and Pharmacokinetics of Single-Dose Novel Oral Androgen 11beta-Methyl-19-Nortestosterone-17beta-Dodecylcarbonate in Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 629-638.
56. Yuen F, Nguyen B T, Swerdloff R S & Wang C. (2020) Continuing the search for a hormonal male contraceptive. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 66, 83-94.
57. Yuen F, Wu S, Thirumalai A, Swerdloff R S, Page S T, Liu P Y, Dart C, Wu H, Blithe D L, Sitruk-Ware R, Long J, Bai F, Hull L, Bremner W J, Anawalt B D & Wang C. (2019) Preventing secondary exposure to women from men applying a novel nesterone/testosterone contraceptive gel. *Andrology* 7, 235-243.
58. Zhang L, Shah I H, Liu Y & Vogelsong K M. (2006) The acceptability of an injectable, once-a-month male contraceptive in China. *Contraception* 73, 548-553.

*Traducido, revisado y editado por la Dra. Rocío Núñez Calonge.*

# ANDROPAUSIA

Cristian Palma Ceppi<sup>1</sup>

Marcelo Marconi Toro<sup>2</sup>

Gerardo Eusebio Ortiz Lara<sup>3</sup>

Saulo Armando Camarena Romero<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Urología Clínica Las Condes. Unidad de Medicina Reproductiva Clínica Las Condes. Departamento de Urología Hospital Clínico Universidad de Chile. <sup>2</sup> Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento de Urología Pontificia Universidad Católica de Chile. <sup>3</sup>Tecnológico de Monterrey, Hospital Zambrano Hellion TecSalud, Servicio de Urología del Centro Médico ABC. <sup>4</sup>Andromex y Academia de Urología de la Universidad de Guadalajara.

Autor Corresponsal: Dr. Cristian Palma Ceppi. Correo electrónico: [cpalma@clc.cl](mailto:cpalma@clc.cl)

## Cápsula

Andropausia es un síndrome que se presenta sobre los 40 años y se caracteriza por bajos niveles de testosterona total (menores de 320-350 ng/dlt) asociado a la presencia síntomas cardinales.

## Resumen

Hipogonadismo de Inicio Tardío (HIT) o comúnmente llamado **Andropausia** se define como un síndrome clínico y bioquímico asociado al avance de la edad, caracterizado por síntomas que en general son inespecíficos y bajos niveles testosterona total. Esta condición puede deteriorar la calidad de vida y afectar negativamente el normal funcionamiento de numerosos sistemas (ej. óseo, cardiovascular, muscular). La prevalencia real del HIT de acuerdo con el *European Male Ageing Study* (EMAS) (1), el estudio más grande y de mejor calidad al respecto, determinó una prevalencia de un 2,1% en población general de hombres entre 40 y 79 años.

Los síntomas más frecuentes de HIT suelen confundirse con los cambios que culturalmente se asocian al envejecimiento normal. Existe relativo consenso en afirmar que los pacientes sintomáticos se benefician de un tratamiento de suplementación con testosterona; sin embargo, aún existen algunas interrogantes respecto de los beneficios al largo plazo de esta.

## Introducción

Como todo síndrome el Hipogonadismo de Inicio Tardío (HIT) es un conjunto de síntomas y signos que permiten formar una unidad diagnóstica que explique el o los motivos de consulta de un paciente. El diagnóstico certero asociado al conocimiento de la fisiopatología del síndrome permite realizar intervenciones específicas para corregir las anomalías detectadas.

El objetivo de este capítulo es presentar una revisión actualizada de los diferentes aspectos de este síndrome, incluyendo datos epidemiológicos, fisiopatológicos y relacionados con alternativas terapéuticas del mismo.



## Diagnóstico

El HIT se define como un síndrome clínico y bioquímico asociado al avance de la edad, caracterizado por síntomas y bajos niveles T plasmática (bajo los niveles considerados como normales para adultos) (2). La definición presenta dos problemas fundamentales. Primero, los síntomas clásicamente asociados a HIT son extraordinariamente inespecíficos, y pueden estar presentes en una gran cantidad de patologías (ej. anemia, hipotiroidismo, depresión, etc.). A consecuencia de esto numerosos estudios han tratado de validar cuestionarios (ej. *Aging Male Symptom Score (AMS)*, *Androgen Deficiency in Aging Men (ADAM)*, etc) que permitan detectar el HIT en la población masculina mayor de 50 años, sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estos cuestionarios es baja, lo que ha llevado a los últimos consensos a no recomendar su uso como herramienta de tamizaje ni diagnóstico (2).

En ese sentido se recomienda realizar la detección de los pacientes con HIT en base a los síntomas característicos del síndrome (**Tabla 1**). Los cuestionarios y score de síntomas son útiles en el seguimiento y control de la mejoría de los síntomas (3).

El segundo problema de la definición del diagnóstico se presenta con el nivel de T que define el límite entre lo normal y patológico. En un último consenso de la: ISA (*International Society of Andrology*), ISSAM (*International Society for the Study of the Ageing Male*), EAU (*European Association of Urology*), EAA (*European Academy of Andrology*) y el ASA (*American Society of Andrology*), se planteó que en un hombre con un valor mayor a 350 ng/dlt no está indicada la sustitución, y que los pacientes con valores bajo 230 ng/dlt se benefician de la terapia de sustitución androgénica (2). En aquellos pacientes con valores de Testosterona Total (TT) entre 230 ng/dlt y 350 ng/dlt, se debe evaluar la severidad de los síntomas y eventualmente calcular los niveles de Testosterona Libre (TL) en base a la TT, SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*) y albúmina. En conocimiento de esa información el paciente y el tratante deberán evaluar los potenciales beneficios y riesgos de la Terapia de Sustitución Androgénica (TSA).

**Tabla 1.** Síntomas característicos de los pacientes con HIT.

Disminución del deseo sexual
Disfunción eréctil y disminución de las erecciones matinales
Disminución de la capacidad para concentrarse
Disminución de la energía
Disminución de la masa muscular

Otro problema del diagnóstico basado en los niveles de T se produce porque estos valores sugeridos por las diferentes sociedades científicas se basan en los valores considerados como normales para los adultos, pero no toma en consideración la disminución normal de la T que se observa con la edad. Este factor sumado a la presencia de numerosos hombres que poseen valores bajos de T sin síntomas aún mantiene el HIT como una entidad clínica poco consistente para algunos médicos (4). Esto último explica el hecho de que aún no existan evidencias contundentes que permitan plantear realizar un tamizaje de niveles de T a la población general para evaluar quien puede o no ser candidato a TSA. Sin embargo, en el paciente sintomático el escenario es distinto ya que la detección de un HIT puede significar una mejoría significativa de su calidad de vida si se realiza un tratamiento y seguimiento adecuado.

Mención aparte merece el tema de que tipo de T medir: total, libre o biodisponible. Sin duda que como enfrentamiento diagnóstico inicial es la TT la más recomendada por su fácil accesibilidad (se realiza en la mayoría de los laboratorios), y la variabilidad de los resultados entre diferentes laboratorios es razonable (2).

La TL, tiene el problema de que el único método confiable para su medición es la diálisis de equilibrio, método complejo, de alto costo y difícil acceso. Todos los otros métodos como análisis inmunológicos, o radioinmunológicos son altamente inespecíficos y poco reproducibles razón por la cual están desaconsejados para el diagnóstico de HIT (2). Si por interés fisiopatológico y de manejo se desea evaluar los niveles de TL lo aconsejable es medir TT, SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*) y albúmina; con esos valores se puede calcular el nivel de TL (<http://www.issam.ch/freetesto.htm>). La correlación entre la fracción libre (medida por diálisis de equilibrio) y la calculada es alta y confiable (5,6). La determinación del valor de T biodisponible que equivale a la unida a albúmina más la libre, no está recomendada para el diagnóstico o seguimiento del HIT (2).

En suma, para el clínico que se enfrenta a un paciente con sospecha de HIT el diagnóstico se basa en la presencia de síntomas (Tabla 1) y de dos valores de TT bajo 350 mg/dlt (2). Es importante destacar que el diagnóstico se basa en dos mediciones, que deben ser realizadas antes de las 10 A.M., esto por la variación circadiana de los niveles de T que pueden llevar a interpretaciones erróneas. Una vez confirmado el diagnóstico, el resto del estudio etiológico debería incluir niveles de Prolactina. En el caso de la FSH y LH, lo habitual es que, en pacientes con HIT, la LH se encuentra normal al igual que la FSH. Esto refleja la falta de respuesta hipotálamo-hipofisiaria a la baja producción de T desde el testículo, lo cual explica la falla mixta (central y periférica) característica de la fisiopatología del HIT.

Por último, tomando en consideración la información previa, es razonable plantear que en un paciente mayor de 50 años que consulta por estos síntomas, o que viene por otro motivo (ej. chequeo prostático) y al preguntar dirigidamente los refiere, además de pensar en patologías clásicas como depresión, hipotiroidismo o incluso cambios normales relacionados con la edad, plantear un eventual HIT e indicar un examen de niveles de T que está disponible en laboratorios de baja complejidad y a un costo razonable. Al igual que en el resto de los diagnósticos en medicina, si uno como clínico no lo sospecha difícilmente podrá detectarlo.

## Epidemiología

La prevalencia real del HIT es de un 2,1% en población general de hombres entre 40 y 79 años (1).

Su incidencia aumenta con la edad y presenta una prevalencia elevada en pacientes diabéticos y/u obesos donde está presente en el 15% a 30% de los hombres (7). En este último grupo la prevalencia de HIT es de alto interés ya que del punto de fisiopatológico como se explicará más adelante, el HIT puede preceder a un síndrome metabólico o a una diabetes mellitus, lo que significa que un abordaje terapéutico eficaz podría generar un efecto positivo en el manejo de patologías crónicas en estos pacientes (8).

Además de los pacientes con síndrome metabólico y diabéticos, existen otros grupos de pacientes en los cuales la prevalencia de HIT parece ser mayor que en la población general (**Tabla 2**). Los pacientes portadores de VIH presentan en varias series clínicas alta prevalencia de HIT, y la TSA en estos pacientes ha demostrado beneficios significativos para la calidad de vida (9). Niveles bajos de T también han sido reportados como factor de riesgo para desarrollar Enfermedad de Alzheimer (EA), y la TSA ha demostrado algunos beneficios también en este grupo de pacientes (10).

### **Tabla 2** Factores de riesgo para desarrollar HIT.

#### Comorbilidades Prevalencia

Sobrepeso u obesidad 75% de los pacientes con HIT

HTA 28% de los pacientes con HIT

Enfermedad cardiaca 17% de los pacientes con HIT

Enfermedad prostática 10% de los pacientes con HIT

Diabetes mellitus 7% de los pacientes con HIT

## Fisiopatología

## **Etiología HIT**

Fisiopatológicamente, el HIT es secundario a una falla mixta; donde el testículo baja la producción de testosterona y el eje hipotálamo/hipófisis no es capaz de producir la cantidad suficiente de LH para estimular la mayor producción de testosterona desde testículo. Normalmente el hombre produce 10 mg de testosterona al día. Después de los 40 años los niveles de T disminuyen paulatinamente en 0,5% por año.

Clásicamente se describen dos tipos de hipogonadismo, el hipogonadotropo (falla hipotálamo hipofisiaria) y el hipergonadotropo (falla testicular primaria). El HIT del punto fisiopatológico corresponde a una falla mixta, es decir existe una falla primaria en la secreción de T desde la célula de Leydig, que en condiciones normales desencadenaría una respuesta hipotálamo-hipofisiaria elevando los niveles plasmáticos de LH. Sin embargo, los niveles de esta hormona se mantienen dentro de niveles normales, es decir no reactivos (una LH anormalmente normal) (11). A nivel testicular la falla en la secreción se explica por una disminución del número de células de Leydig (12) y una menor respuesta a la estimulación por LH (13). A nivel central el aumento de la edad se asocia a una disminución de la amplitud pulsos de GNRH, y a una baja en el número de picos plasmáticos que ocurren durante el día (14). Esto trae como consecuencia que la estimulación de la célula de Leydig este disminuida, lo que se refleja en una baja secreción de T.

Otras alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-testículo asociadas al envejecimiento son la disminución de los niveles de TL y biodisponible, secundario a un aumento de los niveles de SHBG asociado a la edad (15). Por otro lado, los niveles de estradiol circulante también aumentan en pacientes añosos y obesos secundario a la mayor conversión periférica de T por la aromataasa presente en el tejido adiposo. La mayor concentración de estradiol bloquea el eje a nivel central (16).

## **HIT y Riesgo Cardiovascular**

El Male Massachusetts Aging Study (17), publicado en 1994, marcó un hito ya que una de sus conclusiones fue que los hombres con niveles bajos de T tenían mayor mortalidad que sus pares con niveles mayores de T. Este estudio dio el punto de partida para buscar las posibles asociaciones entre estos dos factores. Casi 20 años después, existen múltiples evidencias clínicas y básicas que demuestran que uno de los factores que podría explicar esta asociación es el mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico y sus consecuencias (HTA, DM), con el consiguiente aumento de los factores de riesgo cardiovascular, que poseen los pacientes con hipogonadismo (18,19).

Desde punto de vista epidemiológico, la prevalencia de bajos niveles de T es significativamente mayor en pacientes obesos y diabéticos comparado con controles normales (20). La gran duda fisiopatológica en estos casos es que pasa primero, la obesidad y luego el hipogonadismo, o primero un hipogonadismo que gatilla una resistencia insulínica y todos los eventos posteriores (ej., obesidad, diabetes). En el primer caso, lo que ocurre es que la obesidad se asocia a una mayor conversión periférica de T a estradiol, lo que bloquea el eje hipotálamo - hipófisis - testículo determinando una menor secreción de T desde las células de Leydig. En el caso contrario, el paciente sin factores de riesgo cardiovasculares (ej. HTA, DM, Obesidad) que debuta con un cuadro de hipogonadismo no detectado, desarrolla al mediano plazo un aumento del tejido adiposo especialmente a nivel abdominal; esto determina una cascada de eventos, entre los cuales destaca la activación de factores proinflamatorios como interleuquinas y leptina, que de por si ejercen un efecto negativo sobre el eje HHT (21).

Por otro lado, los mayores depósitos de grasa desencadenan mayor aromatización de la T circulante aumentando los niveles de estradiol, lo que también determina un efecto negativo sobre la producción de testosterona. Del punto de vista metabólico el aumento de los depósitos de grasa desencadena resistencia a la insulina, que se traduce al mediano plazo en un riesgo aumentado de desarrollar diabetes. Todos estos elementos determinan que al largo plazo estos pacientes desarrollan los factores de riesgo cardiovascular clásicos que determinan una mayor morbimortalidad. Un ejemplo clásico de hipogonadismo asociado a aumento de la morbimortalidad cardiovascular al largo plazo, son los pacientes privados de T como opción terapéutica en un cáncer de próstata avanzado, estos pacientes presentan mayor riesgo de desarrollar resistencia insulínica, diabetes, y eventos cardiovasculares (22).

Planteada la conexión fisiopatológica cabe preguntarse si en aquellos pacientes diabéticos, obesos o con síndrome metabólico en los cuales la T se encuentra baja pero que no tienen

síntomas clásicos de hipogonadismo una TSA mejoraría los parámetros metabólicos. Heufelder y cols. (23) trataron de responder esta pregunta, realizando un estudio que incluyó 32 pacientes con síndrome metabólico y diabetes, sin síntomas de hipogonadismo y con niveles plasmáticos de testosterona total bajo 345 ng/dlt. Al comparar un grupo control sin TSA versus el grupo con TSA, se evidenció que el grupo estudio disminuyó de manera significativa la circunferencia abdominal, los niveles de hemoglobina glicosilada y de triglicéridos, este hallazgo ha sido confirmado por otros autores (24). Sin embargo, aun la evidencia es insuficiente como para plantear el uso masivo de TSA en pacientes obesos o diabéticos, con hipogonadismo de laboratorio, pero sin síntomas.

Además de los efectos en la masa muscular y en el tejido adiposo que son beneficiosos para el control de los parámetros metabólicos, la T juega un rol interesante en la fisiología endotelial dado que la óxido nítrico sintetasa, enzima productora de óxido nítrico, depende en su actividad de los niveles de T. Esta relación ha sido estudiada con detalle en la función eréctil. Marín y cols. (25) evaluó en un modelo animal la dependencia de los niveles de óxido nítrico a la T plasmática, y como el hipogonadismo se asocia a una disminución significativa de la actividad de la óxido nítrico sintetasa. A nivel clínico, la TSA en pacientes con HIT se asocia a mejoría de la función eréctil y sin embargo no ejerce efectos significativos sobre la presión arterial en pacientes hipertensos (26,27).

Considerando las evidencias del párrafo anterior es razonable plantear que la TSA en pacientes con HIT debería mejorar la función endotelial a nivel sistémico. Sería esperable, por ejemplo, la disminución de la presión arterial en pacientes hipertensos que reciben tratamiento, al igual que la mejoría de parámetros más específicos de función endotelial; sin embargo, las evidencias en esta área son contradictorias (28, 29).

Un ejemplo de esta contradicción son los pacientes en estado de deprivación androgénica crónica como hormonoterapia en cáncer de próstata y transexualismos hombre-mujer. Estos pacientes no han demostrado tener efectos adversos significativos a nivel endotelial secundarios al hipogonadismo crónico, de hecho, la vasodilatación mediada por flujo, uno de los parámetros que se utiliza para medir función endotelial, es mejor en estos pacientes versus sus pares no hipogonádicos (30,31). En el caso de paciente hipogonádicos que se someten a TSA, generalmente su reactividad endotelial (capacidad de dilatarse) disminuye en la medida que se restablecen los niveles normales de T en plasma, la función endotelial entonces vuelve a ser comparable a la de los individuos "sanos". El significado clínico de este efecto es incierto ya que no existen reportes que certifiquen que la deprivación androgénica sea un factor protector de riesgo cardiovascular (32), de hecho, es al revés, pero aparentemente este mayor riesgo no estaría determinado por un efecto adverso directo de la ausencia de T a nivel endotelial sino más bien por las consecuencias asociadas de hipogonadismo como obesidad, resistencia insulínica y diabetes, que de por si aumentan el riesgo CV de esos pacientes.

Otra evidencia contradictoria al respecto es el reciente estudio publicado por Basarai y cols (33), en el cual se randomizó a 209 hombres hipogonádicos mayores de 65 años que además padecían algún grado de impotencia funcional, a TSA en gel o placebo. El estudio debió ser interrumpido al corto plazo debido al incremento significativo de la morbimortalidad cardiovascular en el grupo que recibió TSA. Este último estudio revela que aún en esta área del conocimiento son necesarios más estudios para evaluar esta singular relación T-endotelio y riesgo cardiovascular.

### **HIT y trastornos del metabolismo óseo**

El depósito de calcio en la matriz ósea depende entre otros factores de los niveles de andrógenos y estrógenos circulantes. Sin embargo, la relación entre la Densidad Mineral Ósea (DMO) y los niveles de T circulantes son en general débiles en la mayoría de los estudios e incluso consideradas como no significativas (34). Al contrario, los niveles de  $17\beta$ -estradiol si demuestran una fuerte correlación con los niveles de DMO (35). En el hombre son dos las fuentes de  $17\beta$ -estradiol; el testículo y la aromatización de los andrógenos circulantes por la aromatasa, ambos contribuyen a mantener el equilibrio entre formación de hueso y resorción ósea. A diferencia de las mujeres en las cuales el declive hormonal es brusco y se produce alrededor de los 50 años, en los hombres el declive de andrógenos es paulatino y más tardío, lo que significa que el deterioro en la masa ósea es tardío y de menor magnitud, lo que determina que en los hombres con HIT el impacto en la DMO es marginal. Sin embargo, estos pacientes generalmente son de mayor peso y con menor fuerza muscular, todo determinado por la baja T circulante. Esto aumenta el riesgo de caídas y mediante este mecanismo estos pacientes pueden tener mayor riesgo de lesiones óseas (36). Mención aparte merecen los pacientes con cuadros de hipogonadismo severo inducido como

en el caso del cáncer de próstata avanzado, en los cuales tanto los niveles de T como de 17β-estradiol disminuyen bruscamente, desencadenando al corto plazo una disminución de la DMO que se traduce en un mayor riesgo de fracturas (37).

### **HIT y deterioro de la función cognitiva**

Los andrógenos circulantes ejercen múltiples efectos a nivel del sistema nervioso central (SNC). Entre otros, han sido relacionados con el estado de ánimo, destrezas verbales y memoria de largo plazo (38,39,40). Varios estudios han relacionado la baja androgénica relacionada a la edad con el desarrollo de Enfermedad de Alzheimer (EA) (41,42), esta asociación es más significativa en aquellos pacientes con un factor de riesgo genético de desarrollo de EA que es la presencia de un alelo de apolipoproteína ε4 (43). Estudios en animales confirman una relación entre la apolipoproteína E, T y EA (44).

Del punto de epidemiológico el *Baltimore Longitudinal Study on Aging* (45) siguió prospectivamente a un grupo de hombres por un promedio de 19 años (rango 4-37), todos ellos fueron diagnosticados como sanos neurológicamente al ingreso del estudio. Aquellos hombres que desarrollaron una EA durante el seguimiento tenían niveles de TL menores que los sanos, a su vez la disminución de los niveles de T precedió la aparición de la EA por 5 a 10 años, estos hallazgos han sido confirmados también por otros grupos (46). Del punto de vista molecular los andrógenos ejercen un efecto protector a nivel neuronal entre otros por un efecto antioxidante que disminuye la degeneración neuronal y mejora la plasticidad de las mismas (47). Al parecer en un grupo específico de pacientes la declinación androgénica que ocurre con la edad tendría un rol en la etiopatogenia de la EA; sin embargo, es poco probable que ese rol sea primordial y exclusivo.

La experiencia con el uso de TSA en pacientes con EA es escasa y los resultados son contradictorios. Luego de un año de tratamiento con T, algunos estudios han demostrado mejorías en el área cognitiva, pero otros no han confirmado estos hallazgos (48,49).

### **HIT y sexualidad**

#### *Deseo Sexual*

Zitzmann y cols. (50), evaluaron en una población de hombres con HIT la aparición de síntomas en relación con los niveles plasmáticos de T. La disminución del deseo sexual era la primera manifestación de bajos niveles de T, y es además uno de los primeros síntomas que se revierte una vez que se ha iniciado la TSA. La T ejerce un efecto a nivel de sistema central, más específicamente en la zona periacueductal, hipotálamo y corteza, a través de la activación sistemas dopaminérgicos que desencadenan un aumento del deseo sexual (51). Dentro de niveles terapéuticos existe una relación directamente proporcional entre los niveles de T y el deseo sexual en los hombres (52). En niveles suprafisiológicos, como por ejemplo en el abuso de andrógenos, en una primera fase se produce un aumento del deseo, sin embargo, a mediano plazo ésta en general disminuye probablemente por la gran conversión periférica de la T a estradiol (53). Del punto de vista clínico la mayoría de los estudios coinciden en el efecto positivo de la TSA sobre la libido (54, 55).

#### *Función Eréctil*

Los niveles plasmáticos de testosterona deben ser extraordinariamente bajos (aproximadamente menos de <230 ng/dlt) para que una disfunción eréctil de origen endocrino motive a un paciente a consultar (50). Sin embargo, bajas discretas de los niveles de T si se asocian a disminución de la calidad de la erección. Un ejemplo de esta situación son los pacientes en los cuales se inicia un tratamiento con bloqueadores de la 5 fosfodiesterasa (ej. sildenafil) y que poseen niveles de T bajo lo normal. Al normalizar los niveles de T, un porcentaje importante de estos pacientes deja de requerir este tipo de fármacos para lograr erecciones satisfactorias. La T estimula directamente la actividad de la óxido nítrico sintetasa, especialmente en los cuerpos cavernosos, por lo tanto regula directamente la función endotelial. Esto queda de manifiesto en estudios de modelo animal en los cuales la estimulación androgénica en tejidos previamente sometidos a ambientes hipoandrogénicos, aumenta la expresión de la óxido nítrico sintetasa y las concentraciones de óxido nítrico (25).

## **Tratamiento**

### **Indicaciones de tratamiento**

La TSA para HIT estaría indicada en el caso de pacientes que cumplan con criterios clínicos (síntomas) y de laboratorio ( $TT < 350 \text{ mg/dlt}$ ). Aquellos pacientes que solo poseen los síntomas, pero tienen T dentro de límites normales no tienen indicación de TSA y se debe buscar otra etiología. En el caso de pacientes asintomáticos, en los cuales se pesquistan de forma incidental TT discretamente bajo los niveles normales considerados para adultos, se deben descartar otras causas de hipogonadismo, Si impresiona como una falla mixta es decir cumple con el perfil fisiopatológico de un HIT pero sin síntomas, la decisión de instaurar una TSA debe ser evaluada en conjunto por el médico y el paciente, tomando en consideración que no existen evidencias consistentes que permitan afirmar que estos pacientes tengan un beneficio en morbimortalidad en mediano o largo plazo asociado a la TSA. En todas otras circunstancias como uso de TSA en síndrome metabólico, obesidad mórbida, VIH, etc., la TSA se utiliza actualmente dentro de protocolos de investigación y su eficacia esta aun por ser demostrada. Al contrario, en todos aquellos pacientes con cuadros de hipogonadismo severo establecido ya sea hipo o hipergonadotropos (ej. Síndrome de Kallmann, Síndrome de Klinefelter), la utilización de TSA está plenamente indicada ya que previene al largo plazo el desarrollo de cuadros como osteoporosis, obesidad, diabetes y otros.

### **Beneficios del tratamiento**

En pacientes que cumplen con los criterios diagnósticos de HIT, la TSA ha demostrado tener efectos positivos en varios sistemas, analizaremos a continuación los beneficios en tres áreas; metabólicos, óseos y sexuales.

#### *Metabólicos*

Restablecer los niveles de T permite al mediano plazo permite disminuir el porcentaje de tejido adiposo y aumentar la masa muscular, si a la TSA se agrega aumento de la actividad física especialmente aeróbica, el cambio en ambos parámetros es aún más significativo (54).

Estos cambios permiten entre otros disminuir los niveles de (55,56,57):

- Resistencia a la insulina
- Interleuquinas proinflamatorias circulantes
- Factor de necrosis tumoral alfa
- Leptina

Todos estos cambios contribuyen a mejorar el ambiente metabólico a nivel sistémico y al parecer no serían consecuencia directa de la elevación de los niveles de T sino más bien de la mejoría en la distribución de la relación tejido adiposo/muscular.

En dosis fisiológicas la TSA no modifica de manera significativa los niveles de LDL ni de HDL (58), sin embargo, asociado a la mejoría de la composición corporal, la TSA podría asociarse a mejores niveles de colesterol al mediano plazo. Las dosis suprafisiológicas de TSA se asocian a bajas en los niveles de HDL e incremento de los niveles de LDL (59).

Finalmente, no existen evidencias que justifiquen la utilización de TSA en pacientes no hipogonádicos para el manejo del a diabetes mellitus, obesidad o síndrome metabólico.

#### *Óseos*

Ya comentamos el efecto de la T sobre el metabolismo óseo. En estudios clínicos la TSA en pacientes hipogonádicos (jóvenes y adultos), mejora al mediano plazo los valores de densidad mineral ósea (60,61). Sin embargo, hasta ahora no está claro que esa mejoría disminuya significativamente en el riesgo de desarrollar fracturas.

## Sexuales

### a) Deseo Sexual

El aumento del deseo sexual asociado a la TSA en pacientes con HIT es probablemente uno de los factores clínicamente más significativos relacionados a esta terapia. Este incremento ha quedado objetivado a través de cuestionarios estandarizados, y a través del aumento del número de encuentros sexuales que estos pacientes refieren antes y después de iniciar la terapia (54,55).

### b) Función Eréctil

Habitualmente los pacientes con HIT que inician una TSA, refieren una mejoría de la calidad de la erección, en cuanto a su rigidez y duración de la misma (62). Esta mejoría tiende a ser mayor mientras menor era el nivel de T previo al inicio del tratamiento. Un porcentaje variable de pacientes que eran consumidores asiduos de inhibidores de la fosfodiesterasa 5, pueden dejar de requerirlos una vez que han elevado los niveles de testosterona, secundario al mejor trofismo de los cuerpos cavernosos (63).

## Riesgos de tratamiento

Las contraindicaciones absolutas y relativas de la TSA se indican en la **Tabla 3**. En consideración de estos factores todo paciente que es candidato a iniciar TSA debe primero ser evaluado por un especialista con experiencia en el tema, esta evaluación debe incluir:

- Antígeno Prostático Específico (APE)
- Tacto Rectal
- Hemograma
- Examen físico mamario
- Score de síntomas prostáticos (IPSS: *International Prostatic Symptom Score*)
- Pruebas Hepáticas

**Tabla 3.** Contraindicaciones absolutas y relativas de la TSA.

A Absolutas
Cáncer de próstata
C    Cáncer de mama
R Relativas
Deseo de fertilidad
Policitemia (Hematocrito >52%)
A    Apnea obstructiva del sueño
II    Insuficiencia Cardíaca CF III o IV
U    Uropatía obstructiva baja moderada o severa (IPSS>21)
D

El efecto adverso más frecuente de la TSA es la Policitemia, que se presenta en aproximadamente el 5.5% de los pacientes (64). En algunos casos el aumento del hematocrito es considerable y obliga a una interrupción transitoria de la terapia. La vía transcutánea parece tener menor riesgo de desarrollar esta complicación (65). Por otro lado, la discontinuación de la terapia es mucha fácil

cuando el paciente está con terapia tópica (gel) que cuando esta con tratamiento de depósito (promedio 3 meses).

Sin lugar a duda que el efecto adverso históricamente más temido de la TSA es el aumento del riesgo de desarrollo de cáncer de próstata. A pesar de las aprensiones existentes, la medicina basada en evidencias no ha demostrado que la TSA aumente el riesgo de desarrollar un cáncer de próstata (66). La desvinculación de una relación causa efecto directo entre T y cáncer de próstata se basa en los siguientes factores:

- El cáncer de próstata aumenta con la edad de los hombres, en cambio la testosterona declina con la edad, es decir existe una relación inversamente proporcional
- Un 21.4% de los pacientes a los cuales se les diagnostica un cáncer de próstata presenta niveles bajos de testosterona plasmática (67).
- No existen estudios que demuestren que la TSA genere, aumente o haga más agresivo un cáncer de próstata (68).
- Se ha utilizado TSA en pacientes con PIN de alto grado en biopsias prostáticas transrectales, lesión considerada precursora de cáncer de próstata, ninguno de estos pacientes ha desarrollado un cáncer de próstata posterior a la terapia (69).

Estudios realizados a nivel de parénquima demuestran que la próstata se satura rápidamente de T con niveles plasmáticos cercanos a los niveles considerados de castración (aprox. 50 mg/dlt). Por sobre esos niveles, la concentración T a nivel intraprostático muestra variaciones muy escasas lo cual explicaría los hechos previamente descritos (66).

En suma, en un paciente en el cual se ha descartado la presencia de un cáncer de próstata la TSA se puede indicar con tranquilidad, pero con la precaución de control seriado de APE, como se detallará más adelante.

Otros efectos adversos de menor frecuencia descritos con el uso de TSA son apnea del sueño, infertilidad, acné, alteración de las pruebas hepáticas.

## **Seguimiento**

De acuerdo con las guías conjuntas de la ISA, ISSAM, EAU, EAA y la ASA, las recomendaciones de seguimiento en paciente con TSA consisten a los 3, 6 y 12 meses de iniciado el tratamiento:

Tacto rectal

Antígeno prostático específico

Hematocrito

Niveles de testosterona total

## **Alternativas terapéuticas en TSA**

Las dos alternativas farmacológicas más utilizadas de TSA (Tabla 4) son la presentación en gel y la de depósito

La presentación en gel viene en sobres de 50 mg de testosterona. Se aplica una vez al día. En general la aplicación diaria permite alcanzar niveles terapéuticos a los pocos días de iniciada la terapia. Al aplicarse todos los días los niveles se mantienen estables evitando picos y valles tan característicos de la antigua presentación de enantato de T inyectable. Como ventaja comparativa con esta presentación se puede interrumpir la terapia de manera instantánea, y por otro lado se puede regular la dosis con facilidad. Dos problemas del gel serian la eventual falta de adherencia a la terapia por su aplicación diaria y la transferencia que se puede producir en el contacto íntimo persona-persona, esto último se puede evitar con solo recomendar al paciente que evite ese tipo de contactos después de aplicado el gel.

La segunda presentación es la parenteral (intramuscular) de larga duración, denominada undecanoato de T. Esta presentación viene en una ampolla de 4 ml de suspensión oleosa que se aplica entre 8 a 12 semanas y logra niveles estables y terapéuticos. La ventaja de esta presentación es la adherencia a tratamiento determinada por la ausencia de necesidad de aplicársela a diario, la desventaja es la escasa posibilidad de titular o suspender el tratamiento una vez que se ha iniciado ya que el medicamento tiene una duración prolongada.



**Tabla 4. Alternativas de TSA.**

Presentación	Gel al 1%	Testosterona Undecanoato
Administración	Cutánea	Intramuscular
Dosificación	50 - 100 mg/ día	1000 mg cada 12 semanas
Control	Basal: antes del inicio del tratamiento Control: medir TT a las 2 semanas de iniciada la terapia 2-4 horas post aplicación del gel Controlar a los 3-6-12 meses	Basal: antes del inicio del tratamiento Control: medir TT a las 6-8 semanas de iniciada la terapia realizanco una medición antes de inyectar la siguiente dosis Controlar a los 3-6-12 meses

Otras presentaciones menos disponibles, son los pellets sublinguales, lo parches escrotales y los parches cutáneos de larga duración. Los dos últimos tienen características relativamente similares al gel. Las terapias orales o sublinguales en general se desaconsejan por el primer paso hepático que destruye casi en su totalidad el principio activo y por la gran variabilidad en la biodisponibilidad.

### Conclusión

Si bien existe acuerdo en algunos aspectos clínicos y terapéuticos del HIT, aún queda mucho camino por recorrer, en especial para determinar quiénes son los hombres que realmente se beneficiarían de una TSA a largo plazo, definir la relación entre esa terapia y el riesgo cardiovascular y finalmente el potencial beneficio de una TSA en pacientes con niveles bajos de testosterona, pero sin síntomas.

### Referencias

1. Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged elderly men. *N Engl J Med.* 2010 Jul 8; 363 (2):123-35.
2. Wang C., Nieschlag E., Swerdloff R., Behre H., et al.: "Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations". *Eur J Endocrinol.* 2008 Nov; 159(5):507-14.
3. Taylor F, Levine L.: "Clomiphene citrate and testosterone gel replacement therapy for male hypogonadism: efficacy and treatment cost". *J Sex Med.* 2010 Jan; 7(1 Pt 1):269-76. Epub 2009 Aug 17.
4. Mäkinen J., Huhtaniemi I.: "Androgen Replacement Therapy in Late-Onset Hypogonadism: Current Concepts and Controversies". *Gerontology.* 2010 Aug 2.
5. Vermeulen A., Verdonck L., Kaufman J. "A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum". *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct; 84(10):3666-72.
6. Araujo A., Esche G., Kupelian V., O'Donnell A. et al.: "JB Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men". *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov; 92(11):4241-7. Epub 2007 Aug 14.
7. Araujo A., O'Donnell A., Brambilla D., Simpson W.: "Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men:

- estimates from the Massachusetts Male Aging Study". *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec; 89(12):5920-6.
8. Laaksonen D., Niskanen L., Punnonen K., Nyssönen K., et al.: "Testosterone and sex hormonebinding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men". *Diabetes Care.* 2004 May;27(5):1036-41
  9. Jones T.: "Effects of testosterone on Type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome". *J Diabetes.* 2010 Sep; 2(3):146-56.
  10. Abrams D.: "Use of androgens in patients who have HIV/AIDS: what we know about the effect of androgens on wasting and lipodystrophy". *AIDS Read.* 2001 Mar; 11(3):149-56.
  11. Drummond E., Harvey A., Martins R.: "Androgens and Alzheimer's disease". *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Jun; 16(3):254-9.
  12. Mahmoud A.: "Mechanisms of disease: late-onset hypogonadism". *Nat Clin Pract Urol.* 2006 Aug; 3(8):430-8.
  13. Kaler L., Neaves W.: "Attrition of the human Leydig cell population with advancing age". *Anat Rec.* 1978 Dec; 192(4):513-8.
  14. Ren-Shan G., Barry R.: "Leydig cells: From stem cells to aging Haolin Chen". *Zirkin Mol Cell Endocrinol.* 2009 July 10; 306(1-2): 9-16.
  15. Kaufman J., Giri M., Deslypere J., Thomas G., et al.: "Influence of age on the responsiveness of the gonadotrophs to luteinizing hormone-releasing hormone in males". *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jun; 72(6):1255-60.
  16. Chahal H., Drake W.: "The endocrine system and ageing. *J Pathol.* 2007 Jan; 211(2):173-80.
  17. Zitzmann M.: "Testosterone deficiency, insulin resistance and the metabolic syndrome". *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Dec;5(12):673-81. Epub 2009 Oct 27.
  18. Feldman H., Goldstein I., Hatzichristou D., Krane R., et al.: "Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study". *JB. J Urol.* 1994 Jan;151(1):54-61.
  19. Meuleman E.: "Men's Sexual Health and the Metabolic Syndrome". *J Sex Res.* 2011 Mar; 48(2):142-8.
  20. Corona G., Rastrelli G., Vignozzi L., Mannucci E., et al.: "Testosterone, cardiovascular disease and the metabolic syndrome". *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;25(2):337-53
  21. Haring R., Ittermann T., Völzke H., Krebs A., et al.: "Prevalence, incidence and risk factors of testosterone deficiency in a population-based cohort of men: results from the study of health in Pomerania". *Aging Male.* 2010 Dec; 13(4):247-57.
  22. Kapoor D., Clarke S., Stanworth R., Channer K.: "The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes". *Eur J Endocrinol.* 2007 May; 156(5):595-602.
  23. Van Poppel H, Tombal B.: "Cardiovascular risk during hormonal treatment in patients with prostate cancer". *Cancer Manag Res.* 2011 Mar 2; 3:49-55.
  24. Heufelder A., Saad F., Bunck M., Gooren L.: "Fifty-two-week treatment with diet and exercise plus transdermal testosterone reverses the metabolic syndrome and improves glycemic control in men with newly

- diagnosed type 2 diabetes and subnormal plasma testosterone". *J Androl.* 2009 Nov-Dec; 30(6):726-33. Epub 2009 Jul 3.
25. Kapoor D., Clarke S., Stanworth R., Channer K., et al.: "The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C- reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156:595-602.
  26. Marin R., Escrig A., Abreu P., Mas M.: "Androgen-dependent nitric oxide release in rat penis correlates with levels of constitutive nitric oxide synthase isoenzymes". *Biol Reprod.* 1999 Oct; 61(4):1012-6.
  27. Corona G., Maggi M.: "The role of testosterone in erectile dysfunction". *Nat Rev Urol.* 2010 Jan; 7(1):46-56. Epub 2009 Dec 8.
  28. Haddad R., Kennedy C., Caples S., Tracz M., et al.: "Testosterone and cardiovascular risk in men: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials". *Mayo Clin Proc.* 2007 Jan; 82(1):29-39.
  29. Simon D., Charles M., Nahoul K., Orssaud G., et al.: "Association between plasma total testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: the Telecom study". 1997; *J Clin Endocrinol Metab* 82:682-685.
  30. Oh J., Barrett-Connor E., Wedick N., Wingard D.: "Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study". 2002; *Diabetes Care* 25:55-60.
  31. Herman S., Robinson J., McCredie R., Adams M., et al.: "Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2004-2009.
  32. McCrohon J., Walters W., Robinson J., McCredie R., et al.: "Arterial reactivity is enhanced in genetic males taking high dose estrogens". *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1432-1436.
  33. Zitzmann M., Brune M., Nieschlag E. "Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution". *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov; 87(11):5030-7.
  34. Basaria S., Coviello A., Travison T., Storer T., et al.: "Adverse events associated with testosterone administration". *N Engl J Med.* 2010 Jul 8; 363(2):109-22.
  34. Goemaere S., Van Pottelbergh I., Zmierzak H., Tøye K., et al.: "Inverse association between bone turnover rate and bone mineral density in community-dwelling men 70 years of age: no major role of sex steroid status". *Bone* 2001; 29:286-291.
  35. Khosla S., Melton L., Atkinson E., O'Fallon W., et al.: "Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen". *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2266-2274.
  36. Szulc P., Munoz F., Claustrat B., Garnero P., et al.: "Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis in men: the MINOS study". *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jan; 86(1):192-9.
  37. Stoch S., Parker R., Chen L., Bubley G., et al.: "Bone loss in men with prostate cancer treated with gonadotropin-releasing hormone agonists". *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2787-2791.
  38. Gouchie C., Kimura D.: "The relationship between testosterone levels and cognitive ability patterns". *Psychoneuroendocrinology* 1991; 16:323-334.

39. Alexander G., Swerdloff R., Wang C., Davidson T., et al.: "Androgen-behavior correlations in hypogonadal men and eugonadal men. II Cognitive abilities". *Horm Behav* 1998; 33:85-94.
40. Barrett-Connor E., Goodman-Gruen D., Patay B.: "Endogenous sex hormones and cognitive function in older men. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism" 1999; 84:3681-3685.
41. Hogervorst E., Combrinck M., Smith A. "Testosterone and gonadotropin levels in men with dementia". *Neuroendocrinology Letters* 2003; 24:203-208.
42. Hogervorst E., Lehmann D., Warden D., McBroom J., et al.: "Apolipoprotein E epsilon 4 and testosterone interact in the risk of Alzheimer's disease in men". *Int. J. Ger. Psych* 2002; 17:938-940.
43. Strittmatter W., Roses A.: "Apolipoprotein E and Alzheimer disease". *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4725-4727.
44. Ramsden M., Nyborg A., Murphy M., Chang L., et al.: "Androgens modulate beta-amyloid levels in male rat brain". *J Neurochem* 2003; 87:1052-1055.
45. Moffat S., Zonderman A., Metter E., Kawas C., et al.: "Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men". *Neurology* 2004; 62:188-193.
46. Rosario E., Chang L., Stanczyk F., Pike C.: "Age-related testosterone depletion and the development of Alzheimer disease". *Jama* 2004; 292:1431-1432.
47. Ahlbom E., Prins G., Ceccatelli S.: "Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress- induced cell death through a receptor mediated mechanism". *Brain Research* 2001; 892:255-262.
48. Tan R., Pu S.: "A pilot study on the effects of testosterone in hypogonadal aging male patients with Alzheimer's disease". *Aging Male* 2003; 6:13.
49. Lu P., Masterman D., Mulnard R., Cotman C., et al.: "Effects of testosterone on cognition and mood in male patients with mild Alzheimer disease and healthy elderly men". *Arch Neurol* 2006; 63:177-185.
50. Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E.: "Association of specific symptoms and metabolic risks with serum testosterone in older men". *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Nov; 91(11):4335-43. Epub 2006 Aug 22.
51. Simon J.: "Low sexual desire is it all in her head? Pathophysiology, diagnosis, and treatment of hypoactive sexual desire disorder". *Postgrad Med.* 2010 Nov; 122(6):128-36.
52. Allan C., Forbes E., Strauss B., McLachlan R.: "Testosterone therapy increases sexual desire in ageing men with low-normal testosterone levels and symptoms of androgen deficiency". *Int J Impot Res.* 2008 Jul-Aug; 20(4):396-401. Epub 2008 Jun 5.
54. Turillazzi E., Perilli G., Di Paolo M., Neri M., et al.: "Side Effects of AAS Abuse: An Overview". *Rev Med Chem.* 2011 May 1; 11(5):374-89.
53. Mudali S., Dobs A., "Effects of testosterone on body composition of the aging male". *Mech Ageing Dev.* 2004 Apr; 125(4):297-304.
54. Kapoor D., Goodwin E., Channer K., Jones T. "Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes". *Eur J Endocrinol.* 2006 Jun; 154(6):899-906.

55. Kapoor D., Clarke S., Stanworth R., Channer K., et al.: "The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes". *Eur J Endocrinol*. 2007 May; 156(5):595-602.
56. Basu R., Dalla Man C., Campioni M., Basu A., et al.: "Effect of 2 years of testosterone replacement on insulin secretion, insulin action, glucose effectiveness, hepatic insulin clearance, and postprandial glucose turnover in elderly men". *Diabetes Care*. 2007 Aug; 30(8):1972-8. Epub 2007 May 11.
57. Whitsel E., Boyko E., Matsumoto A., Anawalt B., et al.: "Intramuscular testosterone esters and plasma lipids in hypogonadal men: a meta-analysis. *Am J Med*. 2001 Sep; 111(4):261-9.
58. Singh A., Hsia S., Alaupovic P., Sinha-Hikim I., et al.: "The effects of varying doses of T on insulin sensitivity, plasma lipids, apolipoproteins, and C-reactive protein in healthy young men". *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan; 87(1):136-43.
59. Amory J., Watts N., Easley K., et al.: "Exogenous testosterone or testosterone with finasteride increases bone mineral density in older men with low serum testosterone". *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:503-10.
60. Snyder P., Peachey H., Hannoush P., et al.: "Effect of testosterone treatment on bone mineral density in men over 65 years of age". *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1966-72.
61. Aversa A., Isidori A., Greco E., Giannetta E., et al.: "Hormonal supplementation and erectile dysfunction". *Eur Urol*. 2004 May; 45(5):535-8.
62. Greco E., Spera G., Aversa A.: "Combining testosterone and PDE5 inhibitors in erectile dysfunction: basic rationale and clinical evidences". *Eur Urol*. 2006 Nov; 50(5):940-7. Epub 2006 Jul 13. Review. Erratum in: *Eur Urol*. 2007 Mar; 51(3):872.
63. Snyder P., Peachey H., Hannoush P., Berlin J., et al.: "Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age". *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Aug; 84(8):2647-53.
64. Dobs A., Meikle A., Arver S., Sanders S., et al.: "Pharmacokinetics, efficacy, and safety of a permeation-enhanced testosterone transdermal system in comparison with bi-weekly injections of testosterone enanthate for the treatment of hypogonadal men". *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct; 84(10):3469-78.
65. Isbarn H., Pinthus J., Marks L., Montorsi F., et al.: "Testosterone and prostate cancer: revisiting old paradigms". *Eur Urol*. 2009 Jul; 56(1):48-56. Epub 2009 Apr 8.
68. Salonia A., Gallina A., Briganti A., Abdollah F., et al.: "Preoperative hypogonadism is not an independent predictor of high-risk disease in patients undergoing radical prostatectomy". *Cancer*. 2011 Mar 1. doi: 10.1002/cncr.25985.
66. Rhoden E., Morgentaler A.: "Testosterone replacement therapy in hypogonadal men at high risk for prostate cancer: results of 1 year of treatment in men with prostatic intraepithelial neoplasia". *J Urol*. 2003 Dec; 170(6 Pt 1):2348-51.

# EFFECTOS TÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN A METALES Y PLAGUICIDAS SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES Y SU REPERCUSIÓN EN LA FERTILIDAD

Eduardo Rojas-Prado

Aylín Larrañaga-Parrado

María de Jesús Solís-Heredia

Betzabet Quintanilla-Vega

Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Ciudad de México, México.

Autor correspondiente: Dra. Betzabet Quintanilla-Vega. Correo electrónico: [mquintan@cinvestav.mx](mailto:mquintan@cinvestav.mx)

## Cápsula

La exposición a metales y plaguicidas ocasiona toxicidad a nivel reproductivo (daño testicular/tubular, disminución de la calidad espermática, integridad de la cromatina, etc.), lo cual repercute en la fertilidad masculina.

## Abreviaturas

AChE- Acetilcolinesterasa; As- Arsénico; BHT- Barrera hematotesticular; CAR- Carbamatos; Cd- Cadmio; DDT- Dicloro difenil tricloroetano; FSH- Hormona folículo estimulante; hCG- Gonadotropina coriónica humana; HPG- Eje hipotálamo-pituitaria-gónada; LH- Hormona luteinizante; NEO- Neonicotinoides; OC- Organoclorados; OF- Organofosforados; OMS- Organización Mundial de la Salud; PAPS- Plaguicidas altamente peligrosos; Pb- Plomo; PIR- Piretroides; RA- Reacción acrosomal; ROS- Especies reactivas de oxígeno; SCSA- *Sperm Chromatin Structure Assay*

## Generalidades

La infertilidad es un problema de salud pública a nivel mundial y afecta a más de 180 millones de personas. Dentro de esta, el factor masculino es responsable de aproximadamente 50% de los casos y se ha reportado que la incidencia de infertilidad masculina va en aumento junto con el deterioro de la calidad espermática (1). Existen múltiples causas de la infertilidad masculina, entre ellas están los trastornos endocrinos (generalmente hipogonadismo y criptorquidia, entre otros), trastornos del transporte de espermatozoides (obstrucción de los epidídimos), defectos testiculares e idiopáticas (hombres infértiles con calidad de semen normal) (2).

A pesar de que la preocupación por el deterioro de la calidad del semen inició en la década de 1970, no fue hasta el año 2000 que comenzó a crecer el interés por la contribución de las exposiciones ocupacionales y ambientales a agentes tóxicos en la disminución de la calidad espermática e infertilidad masculina. Dentro de los agentes tóxicos que ocasionan efectos en la función reproductiva masculina se encuentran los metales como el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) y metaloides como el arsénico (As, el cual será referido dentro de los metales en este capítulo), así

como los plaguicidas carbamatos (CAR), organofosforados (OF), organoclorados (OC), piretroides (PIR) y neonicotinoides (NEO). Estos pueden actuar sobre el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG), ocasionar daño testicular/tubular y daño en la cromatina/ADN, disminuyendo la calidad espermática, lo que por ende ocasiona una menor tasa de fertilización y alteraciones en el desarrollo embrionario.

El contenido del presente capítulo se redactó en base a artículos originales y de revisión que presentaran resultados detallados de estudios *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos referentes a la cinética, efectos tóxicos en la reproducción masculina y tasa de fertilización, efectos a nivel epigenético, así como a aquellos de tipo multi y transgeneracional de metales (Pb, Cd y As) y plaguicidas (CAR, OC, OF, PIR y NEO) publicados a partir del año 2000, cuando se le comenzó a dar importancia a los problemas de fertilidad humana y en particular a la fertilidad masculina. Se consultaron las bases de datos de PubMed, la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), arrojando un total de aproximadamente 90 artículos o revisiones sobre los contaminantes mencionados.

### **Generalidades de los metales**

En este capítulo nos enfocamos al As, Cd y Pb, los cuales, aparte de ser contaminantes de interés en salud pública en México, se encuentran dentro de la lista de prioridades de la ATSDR, en base a la frecuencia, toxicidad y potencial de exposición humana (3). La presencia de estos en el ambiente se debe principalmente a fuentes antropogénicas (3 a 10 veces más que las fuentes naturales), entre las que destacan la minería, metalurgia, combustión de combustibles fósiles, así como la incineración y eliminación de residuos urbanos, agrícolas, industriales y hospitalarios que contiene elementos metálicos. Estos metales son utilizados en pinturas, juguetes, productos cosméticos, aleaciones en baterías, entre otros. En particular el Pb se utiliza en esmaltes que recubren la cerámica/loza de barro, constituyendo la principal fuente de exposición a este metal en zonas no mineras de México (4); el Cd se emplea en la manufactura de fertilizantes y se elimina en el humo del cigarro, y el As se utiliza en la manufactura de plaguicidas y como preservador de madera, aunque es un contaminante natural de los mantos freáticos en el centro-norte de México (5) y países de América Latina (Argentina, Bolivia, Chile, entre otros) (6). El aumento de la contaminación de alimentos y medio ambiente (aire, agua y suelo) con estos metales hace inevitable la exposición humana. Se han reportado múltiples efectos tóxicos por la exposición a estos metales como lesiones cutáneas, daño vascular, disfunción gastrointestinal, de los sistemas inmunológico y reproductivo, trastornos neurológicos, defectos en el desarrollo y cáncer. La mayoría de las personas pueden estar expuestas a más de un metal, por lo cual podrían generarse efectos sinérgicos (7).

### **Generalidades de los plaguicidas**

Otro grupo de agentes tóxicos de gran importancia en la actualidad son los plaguicidas, que son empleados en salud pública para el control de vectores transmisores de enfermedades y en la agricultura para proteger los cultivos contra insectos, hongos, malezas y otras plagas. Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo a su toxicidad, por la plaga que combaten (insecticidas, fungicidas, herbicidas, entre otros) o por su composición química, entre ellos están los grupos de plaguicidas CAR, OC, OF, PIR, NEO, entre otros (8).

Durante las primeras décadas del siglo XX, los intentos de desarrollar plaguicidas se centraron en extractos de plantas y productos químicos inorgánicos, los cuales en su mayoría contenían As. A partir de la Segunda Guerra Mundial comenzó la síntesis de plaguicidas OC, OF y CAR; el primer compuesto OC sintetizado fue el dicloro difenil tricloroetano (DDT) que con su uso logró detener la propagación del tifus, por su alta eficacia contra varios artrópodos (9). En particular en México, el DDT se empleó por décadas para el control de la malaria que costaba cientos de miles de vidas, hasta el año 2000 que se prohibió su uso (10). Estos plaguicidas fueron prohibidos en el Convenio de Estocolmo (11), ya que se consideran contaminantes orgánicos persistentes (COPs) que se bioacumulan en la cadena trófica y provocan efectos perjudiciales para la vida silvestre, salud humana y medio ambiente (12). A pesar de su prohibición, la OMS continúa recomendando el uso del DDT en campañas para combatir la malaria en países endémicos principalmente en América Latina, África y Asia, hasta que se desarrollen alternativas que igualen el costo-beneficio (9).

Posteriormente comenzó la síntesis de los OF, plaguicidas menos persistentes, pero con una mayor toxicidad para organismos no objetivo, que comparten la característica de ser inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), que es la enzima encargada de hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina en las uniones sinápticas, por lo tanto, tiene una función esencial en el sistema nervioso. Paralelamente se introdujeron al mercado los plaguicidas CAR, los cuales inhiben a la AChE de forma similar a los OF. Para el año 1930, comenzó la síntesis de los plaguicidas PIR, compuestos con menor persistencia que los OC y menor toxicidad que los OF. Por otra parte, la producción de los NEO comenzó a finales de 1980, estos plaguicidas actúan selectivamente sobre subtipos de receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) que se encuentran solo en los insectos; sin embargo, estudios recientes han reportado efectos nocivos sobre otros organismos (12). Recientemente se demostró que los NEO afectan negativamente la salud de los polinizadores, como las abejas, siendo prohibidos en varios países (13). El uso excesivo de plaguicidas y las carentes medidas de seguridad y regulación causan graves riesgos para la salud humana provocando trastornos respiratorios, neurológicos, reproductivos y cáncer (14).

En este capítulo nos enfocamos en algunos plaguicidas considerados altamente peligrosos (PAPs), por su alta toxicidad, por su persistencia en el ambiente o por estar incluidos en el Convenio de Estocolmo que entró en vigor en el 2004, cuyo objetivo es proteger la salud humana y el medio ambiente de los COPs (11). El Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático publicó las estrategias para la gestión responsable de plaguicidas en México (15); sin embargo, varios PAPs se utilizan ampliamente en nuestro país, entre ellos algunos OF como el metil paratión y metamidofos, y otros OC como el DDT y endosulfán.

## **Cinética de los metales y plaguicidas**

La población está potencialmente expuesta a los metales y plaguicidas de manera ambiental y ocupacional; estos pueden ingresar al organismo principalmente por la ingestión de alimentos o agua contaminados (vía oral), así como al respirar polvo o tierra que los contengan (vía inhalatoria) y en menor proporción mediante la vía dérmica. La toxicocinética de los xenobióticos (compuestos extraños al organismo) ha desempeñado y seguirá desempeñando un papel importante en la evaluación de la exposición, la respuesta tóxica y el riesgo en los seres humanos expuestos (16).

### **Metales**

Al ingresar al organismo, el Pb se une a los eritrocitos (más de 90%) y el Pb en el plasma se distribuye a varios órganos y tejidos y se almacena en el hueso donde puede permanecer durante décadas; durante el embarazo, la lactancia y la vejez, el Pb puede mobilizarse de los huesos y entrar nuevamente a la circulación sanguínea; su tiempo de vida media es de aproximadamente 35 días (17). Se ha documentado la distribución del Pb a tejidos reproductivos como próstata, vesículas seminales y testículos, en ese orden (18). No experimenta metabolismo y su principal vía de eliminación es la orina (17). El Pb tiene la capacidad de desplazar al calcio de varias proteínas, interactuar con proteínas que unen zinc y con grupos sulfhidrilo, fosfato y carboxilo, alterando su función (19).

El Cd es distribuido en la sangre por la albumina, no experimenta metabolismo y se acumula principalmente en el hígado y los riñones, así como en la glándula pituitaria, hipotálamo y testículo, en ese orden (20). El Cd se une a la metalotioneína (proteína que une metales) y el complejo Cd-metalotioneína se reabsorbe y ocasiona daño en el túbulo proximal de la nefrona. El tiempo de vida media del Cd en el organismo es de aproximadamente 26 años. La orina es la vía más importante de excreción del Cd, no obstante, solo representa una pequeña fracción de la carga corporal (21,22).

Después de ser absorbido, el As se distribuye a varios tejidos (hígado, riñones, vejiga, etc), se metaboliza mediante reacciones de óxido-reducción y metilación, generando metabolitos aún más tóxicos como el ácido monometil arsónico (MMA). Se ha reportado la acumulación del As en los testículos, vesículas seminales, epidídimo y próstata (23). La orina es la principal vía de excreción del As y sus metabolitos mono y dimetilados; su tiempo de vida media es de aproximadamente 10 horas (24).

### **Plaguicidas**



Los plaguicidas son muy lipofílicos por lo que después de la exposición se absorben rápidamente, se distribuyen principalmente en el tejido adiposo y otros tejidos, incluyendo el hígado, los riñones y el sistema nervioso (25). Se metabolizan principalmente en el hígado, mediante enzimas de fase I (reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis) y de fase II (formando conjugados de ácido glucurónico y sulfato). La excreción del compuesto padre y sus metabolitos es principalmente por la orina, pero también puede ocurrir a través de las heces (por la circulación enterohepática de algunos plaguicidas o de la fracción no absorbida en el tracto gastrointestinal) y en la leche materna. Los plaguicidas de interés en este capítulo son neurotóxicos que alteran los sistemas colinérgicos, dopaminérgico y glutamatérgico. Los residuos de plaguicidas y sus metabolitos atraviesan la barrera placentaria y se han detectado en la placenta, el cordón umbilical y en el feto (26).

## **Efectos reproductivos**

### **Eje hipotálamo-pituitaria-gónada**

El eje HPG en el hombre está compuesto por el hipotálamo, glándula pituitaria y testículos. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula a la glándula pituitaria, la cual secreta dos hormonas para la reproducción, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), así como la adrenocorticotropina, hormona del crecimiento, prolactina y hormona estimulante de la tiroides cuyas funciones en la reproducción son poco conocidas. La LH y FSH actúan sobre las células de Leydig y de Sertoli, respectivamente, ubicadas en los testículos. Las células de Leydig son productoras de la testosterona, mientras que las de Sertoli producen la inhibina B; ambas hormonas retroalimentan negativamente al hipotálamo y la glándula pituitaria. Cualquier alteración en las hormonas mencionadas puede afectar la espermatogénesis, teniendo repercusiones en la fertilidad masculina (27).

### *Efectos de los metales*

Se ha descrito en ratas expuestas crónicamente al As (5 mg/kg/día por 4 semanas) a través del agua de bebida, la alteración del eje HPG, representada por modificación de las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, testosterona plasmática y testicular; así como el aumento de la concentración plasmática de corticosterona, lo que resultó en la disminución del peso testicular y la cuenta de espermatozoides (28). La exposición ambiental a Cd en trabajadores urbanos se correlacionó inversamente con los niveles de FSH y LH (29). Mientras que, estudios realizados en ratas expuestas a Cd (50 ng/mL en el agua de bebida, durante 30 días) reportaron una reducción de los niveles de testosterona y acumulación del colesterol, con la consecuente represión de la esteroidogénesis y alteraciones en la conducta sexual de los animales tratados (30,31). En cuanto al Pb, un estudio de acoplamiento molecular mostró que este metal podía unirse a 5 sitios de la gonadotropina coriónica humana (hCG) disminuyendo su actividad, lo que lleva a la disminución de la testosterona testicular (32).

### *Efectos de los plaguicidas*

Respecto a los plaguicidas, se ha planteado que los OC y PIR pueden tener efectos inhibidores sobre la producción de esteroides en los testículos, reduciendo los niveles hormonales, lo que puede aumentar la producción de FSH y LH a través de la retroalimentación negativa del eje HPG (33–35). En particular, los OC, como el lindano disminuyó la producción de testosterona, la concentración del segundo mensajero AMPc y del receptor LH/hCG en las células de Leydig de ratas incubadas con 100 y 200 µg/mL (36). Por su parte, el OC metoxicloro (dosis única de 50 mg/kg de peso corporal) provocó la disminución de la proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR) junto con el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que indican estrés oxidante y una disminución de la proteína de unión a andrógenos en testículos de ratas macho, reduciendo la esteroidogénesis (37). Estudios epidemiológicos han reportado asociaciones negativas entre la presencia de metabolitos de los OF y PIR en la orina con hormonas producidas por el eje HPG. Recio y col. (38) reportaron una asociación negativa entre las concentraciones urinarias del metabolito dimetiltiofosfato (DMTP), marcador de exposición de plaguicidas OF, y los niveles séricos de FSH y LH en hombres de una comunidad agrícola del estado de Durango, México, expuestos a mezclas de plaguicidas, entre ellos los OF. También se ha reportado que la concentración urinaria del metabolito ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA),

biomarcador de exposición a plaguicidas PIR, se asoció positivamente con los niveles de la LH sérica en hombres infértiles de origen chino (exposición no ocupacional) (33). En otro estudio se observó una relación positiva entre los niveles urinarios del 3-PBA con los niveles séricos de LH y FSH, además de una asociación negativa de otros metabolitos de los PIR con la testosterona sérica y la inhibina B en hombres infértiles del estado de Massachusetts, EUA (exposición no ocupacional) (34).

#### *Daño testicular/tubular*

La exposición a metales y plaguicidas, principalmente en estudios experimentales, está relacionada con efectos en el tamaño, morfología y función testicular, daño a nivel de los túbulos seminíferos y sobre la barrera hematotesticular (BHT), así como citotoxicidad en las células de Leydig y de Sertoli.

#### *Efectos de los metales*

Se ha descrito que la exposición a Cd (1 mg/kg/día por 10 y 21 días, vía intraperitoneal) ocasiona la degeneración de los túbulos seminíferos, ensanchamiento del espacio intersticial, ausencia de la espermatogénesis, daño testicular, disminución de enzimas antioxidantes, aumento del estrés y daño oxidante en ratas (39), así como ruptura de la BHT a la dosis de 2.5 mg/kg/día (vía intragástrica, días alternos durante 2 meses) en ratones (40). Por otra parte, se ha reportado que los adolescentes que viven cerca de áreas contaminadas con Pb tienen un volumen testicular más pequeño (41). De igual manera, la exposición a As en ratas (10 mg/L en el agua de bebida por 56 días) ocasionó la reducción del número de células de Leydig y de la actividad de la enzima catalasa; así como vacuolización en el epitelio seminífero (42), interrupción de la espermatogénesis (reducción del diámetro tubular seminífero) con la reducción de la población de espermatoцитos y espermátidas, así como atrofia en las células de Leydig en ratones expuestos (30 y 40 mg/L en el agua de bebida por 30, 45 y 60 días) (43). Jana y col. (28) reportaron la disminución del peso de los testículos, cuenta baja de espermatozoides en el epidídimo, aumento de la concentración plasmática de corticosterona, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa, así como alteración de la sorbitol deshidrogenasa en ratas expuestas a As (5 mg/kg/día en el agua de bebida, durante 2 semanas).

#### *Efectos de los plaguicidas*

En el caso de los plaguicidas no es la excepción que causen efectos a nivel del tracto reproductivo masculino. Kenfack y col. (44) observaron en ratas, un aumento en el peso de los testículos, desorganización de los epitelios seminíferos y pérdida de células germinales por exposición al plaguicida CAR propoxur (0.583 mL/kg del día posnatal 30 al 120, vía intragástrica). Elsharkawy y col. (45) observaron una reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión reductasa, además de un aumento en la peroxidación de lípidos en el tejido testicular por exposición al plaguicida OF clorpirifos en ratas (30 mg/kg durante 90 días, dos veces por semana). Narayana y col. (46) reportaron alteraciones en la histología testicular que incluían túbulos atrofiados, vacuolas, desprendimiento epitelial y células gigantes multinucleadas en ratas expuestas (1, 4 y 5 mg/kg durante 5 y 25 días, vía intraperitoneal) al plaguicida OF metil paratión (plaguicida prohibido en varios países, pero usado en México). Por su parte, el plaguicida OF metamidofos (prohibido en varios países y autorizado en México) ocasionó la apertura de la BHT por alterar la expresión, fosforilación y localización de las proteínas que la conforman (proteínas de uniones estrechas), alterando la espermatogénesis con la aparición de células germinales inmaduras en el epidídimo de ratones expuestos (5 mg/kg/día durante 4 días, vía intraperitoneal) (47). Mientras que, Urióstegui-Acosta y col. (48) reportaron atrofia de los túbulos seminíferos, menor cantidad de células germinales en el epitelio y deterioro de la progresión de la espermatogénesis, sugiriendo daño en los compartimentos formados por la BHT en ratones expuestos al plaguicida (3-12 mg/kg/día durante 5 días, vía intraperitoneal). Finalmente, otro OF, el dimetoato ocasionó una disminución del peso de los testículos y degeneración severa de los túbulos seminíferos (desprendimiento y atrofia), degeneración de las células germinales y detención parcial de la espermatogénesis en ratas expuestas (20 mg/kg durante 90 días, vía oral) (49).

De forma similar, los plaguicidas OC afectan la morfología testicular, como es el caso de la exposición al endosulfán en ratas (7.5 o 10 mg/kg, vía oral) donde se observó edema intertubular junto con el encogimiento de los túbulos en el lumen, material necrótico, eosinófilos en el lumen, interrupción de la progresión espermática, reducción en el número de células de Sertoli y pérdida de la viabilidad de las células de Leydig (50). De igual manera se ha descrito que el DDT (0.1, 1 y 10  $\mu$ M) interrumpe las uniones célula-célula de la línea SerW4 de células de Sertoli e internaliza proteínas de unión en forma de vacuolas; estas uniones son esenciales para mantener la homeostasis tisular, el control de la proliferación y diferenciación celular (51). Los efectos tóxicos en ratas y ratones, por exposición a plaguicidas PIR, incluyen arresto de la espermatogénesis, pérdida de la arquitectura testicular, aumento de la luz de los túbulos seminíferos, ruptura de células epiteliales, edema intersticial, disminución del peso de los testículos, epidídimo, próstata y vesículas seminales, además de citotoxicidad y muerte por apoptosis de las células de Leydig y de Sertoli (52). Por su parte, los NEO como el imidacloprid (0.5, 2 y 8 mg/kg/día durante 90 días, vía oral) ocasionan menor peso del epidídimo, disminución de la calidad espermática y reducción de los niveles de la testosterona, además de muerte celular programada (apoptosis) en ratas (53).

### Disminución de la calidad espermática

La calidad de semen se ha evaluado tradicionalmente con parámetros macro y microscópicos establecidos por la OMS para determinar la capacidad fértil de un hombre (**Tabla 1**). En las dos últimas décadas se ha documentado ampliamente que otros parámetros a nivel molecular y funcional del espermatozoide, como la reacción acrosomal (RA) y la condensación y fragmentación del ADN, son mejores predictores del potencial fértil y desarrollo del embrión (54,55). En la última versión del Manual de la OMS para el Examen y Procesamiento del Semen Humano (56) se dan los nuevos valores de la calidad de semen; sin embargo, se concluye que los datos no son suficientes para establecer límites para tomar decisiones clínicas y se propone la evaluación de la fragmentación del ADN y ensayos genéticos como pruebas extendidas y el daño oxidante y RA como evaluaciones avanzadas. Esto pone de manifiesto que la capacidad fértil de los espermatozoides va más allá de su "calidad" y que es necesario determinar parámetros de su función.

**Tabla 1.** Evolución de los parámetros de calidad espermática establecidos por la OMS.

Parámetro	1994 <sup>†</sup> (57)*	2001 <sup>††</sup> (58)	2010 <sup>‡</sup> (59)	2021 <sup>‡‡</sup> (56)
Volumen (mL)	2	2	1.5	1.4
Concentración (10 <sup>6</sup> /mL)	20	20	15	16
Número de espermatozoides (10 <sup>6</sup> por eyaculado)	40	40	39	39
Motilidad progresiva (%)	50	50	32	30
Morfología (%)	30	15	4	4
Viabilidad (%)	75	75	58	54

\*Se muestran los valores establecidos en los años 1994 a 2001 (Ediciones 3ª a 6ª) y entre paréntesis la referencia. <sup>†</sup>Se consideraron como valores normales. <sup>††</sup> Se consideraron como valores de referencia; <sup>‡</sup> límites de referencia inferior (5° percentil, intervalo de confianza 95%).

††Se consideró que la distribución de los datos no es suficiente para establecer límites de decisión clínicamente útiles (5° percentil, intervalo de confianza 95%).

### *Efectos de los metales*

Los primeros estudios que relacionaron la contribución ocupacional y ambiental sobre metales se enfocaron principalmente en los efectos del Cd y Pb (57). Los efectos del Pb sobre los parámetros de calidad espermática son los más estudiados, se observó que hombres estériles expuestos ambientalmente exhibían concentraciones de Pb en el plasma seminal que correlacionaron inversamente con la disminución en la tasa de fertilización y con alteraciones en la RA (58). De igual manera, en otro estudio realizado en hombres del norte de México expuestos ambientalmente se encontró una asociación entre los niveles de Pb en los espermatozoides y plasma seminal con la disminución de la calidad espermática; mientras que, los niveles de Pb en sangre (9.3 µg/dL) no se asociaron con alteraciones en la calidad espermática (59). En México, el valor criterio de la concentración de Pb en sangre para la población expuesta no ocupacionalmente es de 25 µg/dL (60). Por otro lado, en diversos estudios experimentales se ha reportado que el Pb afecta directamente la espermatogénesis y a los espermatozoides durante el tránsito por el epidídimo (61).

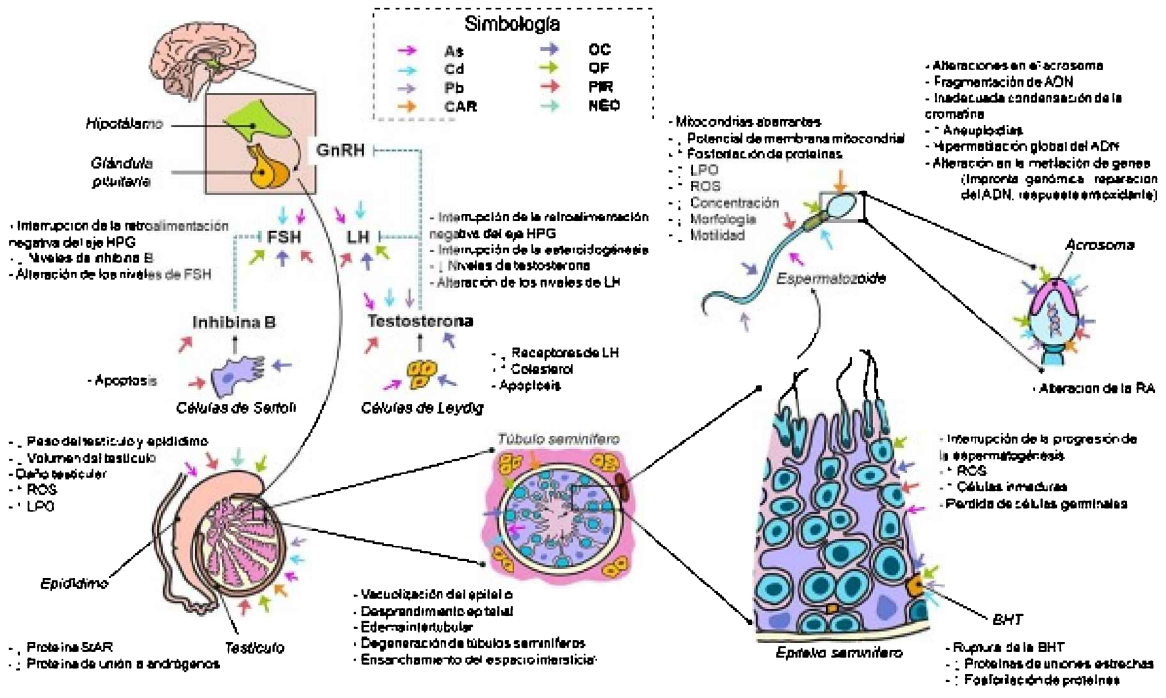
Se ha observado que concentraciones altas de Cd en el plasma seminal de hombres fumadores infértiles, así como valores bajos de antioxidantes en el plasma seminal se relacionaron con mala calidad espermática, en comparación a los hombres no fumadores (62). Por su parte, en modelos murinos, la exposición a Cd se relacionó con el aumento de anomalías morfológicas, motilidad baja y presencia de mitocondrias aberrantes, así como con la disminución en el número de células con acrosoma intacto (63,64). En estudios de exposición *in vitro* a Cd en espermatozoides humanos (25 y 50 nM) y de ratón (10 µM) se reportó disminución en la motilidad espermática y sugieren que el posible mecanismo es por alteración en la actividad de enzimas relacionadas con la biosíntesis del ATP y la fosforilación de proteínas (65,66).

El estudio de los efectos del As sobre la calidad espermática refiere una disminución de la calidad del semen y riesgo de disfunción eréctil en hombres Chinos ambientalmente expuestos (67,68). Diferentes estudios realizados en modelos murinos expuestos a As reportaron una disminución en la concentración, motilidad, vitalidad, morfología y aumento de la peroxidación lipídica en los espermatozoides (69,70). Se ha propuesto que los efectos sobre la motilidad de los espermatozoides se debe a la unión directa del As con los grupos tioles presentes en grandes cantidades en el flagelo de los espermatozoides (71).

### *Efectos de los plaguicidas*

Se han realizado estudios de exposición no ocupacional a plaguicidas OC, donde encontraron concentraciones del principal metabolito del DDT (p,p'-diclorodifenil dicloro etileno [p,p'-DDE]) y lindano en semen de hombres expuestos ambientalmente que acudieron a una clínica de infertilidad en India, los cuales se asociaron negativamente con la calidad espermática y positivamente con el aumento de ROS, daño lipoperoxidante y aumento de células con mitocondrias despolarizadas (72). Mientras que, en un estudio realizado en hombres que vivían en zonas endémicas de malaria en México, la exposición no ocupacional al DDT provocó disminución de la calidad espermática (73).

En el caso de los PIR, CAR y OF, existe evidencia epidemiológica que asocian la exposición ambiental y ocupacional con alteraciones en la calidad del semen. Entre estos estudios se encontró que trabajadores agrícolas del norte de México expuestos a una mezcla de plaguicidas, entre ellos varios OF y OC, presentaron un incremento de células inmaduras en el eyaculado (74); igualmente, en un estudio longitudinal realizado en el estado de Yucatán, México se observó que el 100% de los trabajadores agrícolas expuestos a una mezcla de plaguicidas, entre ellos el metamidofos, presentaron mala calidad espermática, especialmente morfología alterada (75). Mientras que, en un estudio epidemiológico realizado en hombres expuestos ambientalmente a PIR en China reportaron una asociación negativa con los parámetros de calidad espermática (76). Además, la exposición ambiental a los plaguicidas carbaril (CAR) y clorpirifos (OF) se ha asociado con una mala calidad espermática en hombres que asistían a una clínica de infertilidad en EUA (77).



**Efectos en la fertilidad y desarrollo embrionario**

- Mala calidad espermática
- Tasa de fertilización
- Porcentaje de pérdida pre-implantación
- Desarrollo temprano embrionario
- Número de fetos vivos y \* de fetos muertos

**Efectos en la progenie**

- Mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades (ej. Cáncer)
- Peso de los testículos, epidídimos, vesícula seminal y próstata ventral
- Distorsión de la arquitectura del epitelio seminífero y \* de células germinales
- Calidad espermática y \* fragmentación del ADN
- Interferencia en la diferenciación sexual
- Pubertad de inicio temprano y alteraciones del comportamiento

**Figura 1.** Sitios blanco y efectos de los metales y plaguicidas en el eje HPG, su repercusión en la fertilidad y las consecuencias en la progenie. Entre los metales se encuentra el arsénico (As), el cadmio (Cd) y el plomo (Pb). En los plaguicidas se encuentran los OF (clorpirifos, metilparatión, metamidofos, dimetoato diazinon y fenitrotión), OC (lindano, metoxicloro, endosulfán y DDT), CAR (propoxur, carbarilo y carbofurano), NEO (imidacloprid y acetamiprid), PIR, la vinclozolina y atrazina. BHT- Barrera hematotesticular; CAR- Carbamatos; DDT- Dicloro difenil tricloroetano; FSH- Hormona foliculo estimulante; GnRH- Hormona liberadora de gonadotropina; HPG- Eje hipotálamo-pituitaria-gónada; LPO- Lipoperoxidación; LH- Hormona luteinizante; NEO- Neonicotinoides; OC- Organoclorados; OF- Organofosforados; PIR- Piretroides; RA- Reacción acrosomal; ROS- Especies reactivas de oxígeno; StAR- proteína reguladora esteroideogénica aguda.

**Daño a la cromatina/ADN espermáticos**

La integridad de la cromatina espermática es fundamental para la expresión del potencial fértil y se ha reportado que la fragmentación del ADN está relacionada con el desarrollo embrionario, por lo tanto, con la fertilidad en los hombres (55). Varios estudios han documentado la falta de asociación entre los parámetros tradicionales de calidad de semen y la fragmentación del ADN, lo que sugiere que la calidad de semen no predice el potencial fértil en el hombre. Publicaciones recientes indican que la fragmentación del ADN no impide que un espermatozoide fertilice, sin embargo, puede afectar el desarrollo embrionario, la implantación y el embarazo, tanto en reproducción natural como asistida (78). La creciente evidencia señala que la fragmentación del ADN espermático tiene un papel independiente y significativo en la etiología de la infertilidad masculina y complicaciones en el desarrollo embrionario. Dentro de los principales mecanismos implicados en la fragmentación del ADN están la sobreproducción de ROS, muerte por apoptosis, remodelación deficiente de la cromatina, activación de endonucleasas, así como factores exógenos, como la exposición a compuestos tóxicos ambientales (metales, plaguicidas, entre otros) (79). Como se mencionó anteriormente, por la falta de asociación para predecir el potencial fértil, en la última edición del Manual de Laboratorio para el Examen y Procesamiento del Semen Humano, la OMS propone una serie de pruebas para evaluar la integridad del ADN y funcionalidad espermática (56).

### *Técnicas para evaluar el daño en la cromatina y ADN del espermatozoide*

La fragmentación del ADN se caracteriza por la ruptura que produce extremos 5'-3' libres que afectan a una o ambas hebras del ADN. Las pruebas de uso común para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos son el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA, por sus siglas en inglés), el ensayo de marcaje del extremo de muesca de desoxiuridina trifosfato (dUTP) mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL, por sus siglas en inglés), la electroforesis en gel unicelular (ensayo Cometa) y la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD, por sus siglas en inglés) (80).

La prueba de SCSA determina la susceptibilidad *in situ* de desnaturalización ácida del ADN espermático, mediante la tinción con el fluorocromo naranja de acridina que se intercala con el ADN y emite fluorescencia verde si se intercala a la doble hebra (ADN nativo) y roja cuando se intercala a la hebra sencilla (ADN fragmentado); de esta manera permite evaluar la integridad del ADN (%DFI, *DNA Fragmentation Index*) y la condensación de la cromatina (%HDS, *High DNA Stainability*) por citometría de flujo (81).

El ensayo de TUNEL se basa en el etiquetado de los extremos 3' libres del ADN, mediado por la transferencia de dUTP por la polimerasa desoxinucleotidil transferasa terminal. La incorporación de dUTP es directamente proporcional a los sitios de ruptura del ADN, los cuales se pueden identificar por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (82). El ensayo Cometa se basa en la separación de hebras de ADN fragmentadas bajo la influencia de un campo eléctrico dependiendo de su carga y tamaño. Después de la separación, el ADN intacto permanece en la cabeza del cometa, mientras que los fragmentos migran hacia la cola del cometa; los parámetros más frecuentes a determinar son el porcentaje de ADN en la cola del cometa (% ADN) y el momento Olive de la cola (OTM, por sus siglas en inglés) con la siguiente fórmula,  $OTM = \text{distancia entre la cabeza y la cola} \times \% \text{ de la cantidad de ADN en la cola en estado fragmentado}$  (83). La prueba de SCD se basa en el principio de que los espermatozoides con ADN fragmentado no producen el halo característico de aquellos con ADN integro, después de la desnaturalización ácida y la eliminación de las proteínas nucleares; el halo se evalúa mediante microscopía de fluorescencia o campo claro (84). Algunas tinciones con azul de anilina, cromomicina-A3 y azul de toluidina no determinan la fragmentación del ADN, pero proporcionan una medida del nivel de compactación de la cromatina (54).

### *Efectos de los metales*

Se tiene evidencia que los metales pueden provocar daño en la cromatina y ADN espermáticos. Respecto a la exposición al Cd, se ha reportado en modelos murinos que provoca la fragmentación del ADN (evaluada con el ensayo de TUNEL) (64) y una inadecuada condensación de la cromatina (tinción con azul de anilina) (85). Por otro lado, en trabajadores de una planta de baterías en Taiwán expuestos a Pb, se observó una asociación entre los niveles de Pb en sangre ( $\geq 25 \mu\text{g/dL}$ ) y un mayor riesgo de presentar anomalías morfológicas y en la integridad de la cromatina en los espermatozoides; además, se observó una correlación positiva entre estos efectos con la producción excesiva de ROS (86). En hombres expuestos a Pb residentes de Torreón, Coah. México se observó una condensación alta de la cromatina (supercondensación) (mediante tinción con cromomicina-A3 y SCSA), la cual se asoció positivamente con la concentración de Pb en el líquido seminal y el zinc en los espermatozoides. Mientras que, en un estudio realizado en ratones expuestos a Pb (0.06% en el agua de bebida durante 16 semanas) se observó que el Pb se acumuló en el núcleo de los espermatozoides al unirse a los grupos tioles de las proteínas nucleares (protaminas) durante la espermatogénesis y en el tránsito epididimal, alterando la formación de puentes disulfuro y en consecuencia la condensación de la cromatina (por tinción con cromomicina-A3) (18). En un estudio previo sobre el posible mecanismo por el cual el Pb afecta la condensación de la cromatina, se evaluó la interacción del Pb con la protamina 2 humana (HP2) (proteínas que remplazan a las histonas durante la espermatogénesis para condensar a la cromatina y proteger al ADN del espermatozoide) y se observó que el Pb se une a la HP2 y ocasiona un cambio conformacional de la proteína que resulta en la disminución de su unión con el ADN (87).

### *Efectos de los plaguicidas*

La exposición a plaguicidas OF, entre ellos el metil paratión, metamidofos y diazinon, se ha relacionado con alteración en la condensación de la cromatina (mediante SCSA), fragmentación

del ADN (por las pruebas de TUNEL y SCSA) y fosforilación de protaminas (en residuos de serina y tirosina) en células espermáticas en los estadios de mitosis, meiosis y maduración epididimal, reduciendo la capacidad de fertilización (88–90). La fosforilación de las protaminas aumenta su carga negativa y por ende disminuye su unión con el ADN, evitando el buen empaquetamiento del mismo y la condensación de la cromatina (91). Se sabe que los metabolitos oxidados de los OF (oxones) ocasionan un daño al ADN espermático (mediante SCSA) 10 veces mayor que los compuestos padres (92). Agricultores mexicanos del estado de Durango, México expuestos a mezclas de plaguicidas, entre ellos los OF, presentaron alteraciones en la estructura de la cromatina espermática, donde la mayoría de las muestras se clasificaron con potencial de fertilidad bajo (parámetro %DFI >30 del ensayo de SCSA), a pesar de que la mayoría de las muestras se encontraban dentro de los parámetros de análisis de semen propuestos por la OMS (74); mientras que, Pérez-Herrera y col. (75) observaron daño al ADN espermático (técnica de *nick translation*) en agricultores del estado de Yucatán, México que portaban un polimorfismo (*PON1 192RR*) de la enzima que hidroliza a los OF, la paraoxonasa 1, considerado factor de riesgo para estos plaguicidas. Gallegos-Avila y col. (93) reportaron que agricultores del estado de Nuevo León, México ocupacionalmente expuestos al plaguicida CAR carbofurano presentaron espermatozoides binucleados y espermátidas multinucleadas. Por su parte, De Jager y col. (73) observaron en un estudio transversal en hombres que vivían en zonas endémicas de malaria en Chiapas, México, donde se utilizó DDT hasta el año 2000, que este plaguicida se correlacionó con una inadecuada condensación de la cromatina (tinción de azul de anilina). Mientras que, Sánchez y col. (94) reportaron la fragmentación del ADN (ensayo de TUNEL) en una exposición *in vitro* al OC endosulfán (100 µM), así como alteraciones en el acrosoma. Por otro lado, en hombres ambientalmente expuestos a plaguicidas PIR en EUA se observó un incremento en la fragmentación del ADN espermático (ensayo Cometa) (34).

En relación a daño al ADN espermático, se reportó la presencia de aneuploidías espermáticas en los cromosomas X, Y y 18 en muestras de semen de trabajadores agrícolas del norte de México expuestos a mezcla de plaguicidas, entre ellos algunos OF y OC (38). Por otro lado, la exposición ambiental a plaguicidas PIR se correlacionó con el aumento de aneuploidías espermáticas de hombres infértiles en Polonia (95). Además, se ha asociado la exposición al plaguicida CAR carbaril con la fragmentación del ADN (ensayo de TUNEL) y una mayor frecuencia de aneuploidías en trabajadores expuestos laboralmente en una fábrica de plaguicidas en China (96).

### **Tasa de fertilización y desarrollo embrionario**

Existen pocos estudios dirigidos a evaluar los efectos de la contribución paterna en el desarrollo embrionario, comparado con los estudios sobre la contribución materna y el periodo de gestación. El daño al ADN y anomalías en la función de los espermatozoides se han correlacionado con una fertilización deficiente, reducción de las tasas de implantación y embarazo, mientras que el aumento de mutaciones provocadas por el daño al ADN y aneuploidías espermáticas eventualmente conduce a defectos del nacimiento, enfermedades genéticas y cáncer (97).

### **Efecto de los metales**

Se ha observado que la exposición de ratas macho a As (10 mg/L en el agua de bebida por 56 días) provoca el deterioro de la calidad de los espermatozoides mediante la generación de ROS, disminuyendo su potencial de fertilización y aumentando el porcentaje de pérdida pre implantación (98). En un estudio clínico encontraron que, por cada aumento de 10 veces en la concentración de Cd en el semen de los pacientes no fumadores, presentaban una disminución en la tasa de fertilidad de 4.17 veces, mientras que en los pacientes fumadores fue de 5.88 veces (99). Por otro lado, en estudios *in vivo* se ha reportado infertilidad en los animales expuestos al Cd, adicionalmente, se ha observado una disminución del peso y tamaño al nacer, presencia de Cd en el hígado y corazón, así como alteraciones neuroconductuales y en componentes antioxidantes en el hígado, riñón, corazón, cerebro y testículo de su descendencia (85,100). En relación al Pb, se observó que la exposición de los padres al metal antes de la concepción puede ocasionar alteraciones en el ADN de los espermatozoides, aumentando el riesgo de cáncer en la descendencia (101), y la exposición de ratones a 0.01% de Pb en el agua de bebida durante 45 días redujo la capacidad de fertilización *in vitro* de los espermatozoides (102).

### *Efecto de los plaguicidas*

La exposición a plaguicidas también tiene consecuencias en la fertilidad. El plaguicida OF metamidofos disminuyó la capacidad de fertilización de ratones expuestos (2 y 3 mg/kg/día durante 4 semanas, vía intragástrica), esta exposición se asoció con un decremento en el número de fetos vivos e incremento de fetos muertos, así como un incremento en la reabsorción (indicativo de abortos) (103). Adicionalmente, en ratones expuestos a 5 mg/kg/día por 4 días, vía intraperitoneal de este plaguicida se observó una reducción de la capacidad de fertilización *in vitro* de los espermatozoides colectados a los 28 y 45 días posteriores a la exposición, sugiriendo efectos en los estadios de meiosis y mitosis, respectivamente (89). También se ha sugerido que, el metamidofos tiene el potencial de producir efectos adversos heredables, de acuerdo con las alteraciones observadas en la progresión del embrión y en el aumento del número de embriones degenerados (fragmentación o muerte de blastómeros) (104). Por otro lado, se observó que ratones expuestos al OF metil paratión (20 mg/kg, vía intraperitoneal) provocó una disminución de la capacidad de fertilizar a los 7 y 28 días posteriores a la administración, afectando a células en los estadios de maduración epididimal y meiosis, respectivamente (90). Recientemente se reportó que la exposición a ratas macho al plaguicida OF temefos (larvicida recomendado por la OMS en campañas de salud) a la dosis "segura" de 100 mg/kg/día, correspondiente al nivel más bajo con efecto adverso observable (LOAEL, por sus siglas en inglés), por 5 ó 7 días, vía intragástrica redujo la capacidad de fertilización *in vitro* y generó cigotos dañados, sugiriendo un daño en el desarrollo embrionario (105). Finalmente, en un estudio *in vitro* donde se incubaron espermatozoides de ratón con temefos (0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) se observó una disminución de la tasa de fertilización y desarrollo temprano embrionario (formación del blastocisto) (106).

Se ha demostrado que la exposición a NEO tiene efectos nocivos sobre la función de los espermatozoides y el desarrollo embrionario. En espermatozoides de ratón expuestos *in vitro* a los NEO imidaclorid y acetamiprid (5 mM) se reportó que no afectaron la motilidad espermática ni la integridad del ADN, pero si la capacidad de fertilización *in vitro* (formación de pronúcleos), la primera escisión del cigoto y la formación de blastocistos (107), se desconocen los mecanismos.

### **Epigenética**

El papel de la epigenética ha tomado relevancia en la reproducción masculina en los últimos años, tanto en el funcionamiento adecuado de los gametos masculinos, como en el desarrollo embrionario y salud de la descendencia. La epigenética se refiere a la regulación en la expresión de genes sin modificar la secuencia del ADN e incluye modificaciones como la metilación del ADN, modificaciones en histonas y microARN's. La metilación del ADN es un proceso dinámico bien definido, en el que se transfiere un grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) al carbono 5 de la citosina (5mC), el aumento de la metilación del ADN (hipermetilación) conduce al silenciamiento de genes, por el contrario, la disminución en la metilación del ADN (hipometilación) se asocia con una mayor expresión de genes. La exposición a metales y plaguicidas, entre otros contaminantes ambientales, aumenta el riesgo de errores epigenéticos y, en consecuencia, afectan la función espermática, habilidad de fertilización y desarrollo embrionario (108).

### *Epigenoma espermático e infertilidad*

En relación al epigenoma espermático, se ha descrito principalmente el perfil de la metilación del ADN en los espermatozoides (metiloma), el cual se ha relacionado con parámetros de calidad espermática (concentración y motilidad), así como con la integridad de la cromatina y del ADN espermático (109). También se ha observado que alteraciones en la metilación de promotores de genes de la impronta (expresión específica de genes de origen paterno que tienen un papel esencial en el desarrollo embrionario) y genes de la espermatogénesis y del sistema de defensa antioxidante se asocian con el deterioro de la integridad del ADN (110). En un estudio sobre la contribución paterna en la pérdida del embarazo recurrente, no se encontraron diferencias en los parámetros de calidad propuestos por la OMS, pero sí en los niveles de metilación de genes de la impronta e hipermetilación de genes involucrados en la apoptosis y ciclo celular, entre otros, así como hipometilación global del ADN, proponiendo a este último como candidato en el diagnóstico clínico, por la facilidad de su evaluación mediante técnicas de inmunoensayo (111).



Algunos estudios han asociado un aumento en la incidencia de trastornos de la impronta (alteraciones en el número de copias de un gen) en bebés concebidos por reproducción asistida, estos trastornos pueden deberse a alteraciones epigenéticas (metilación del ADN) en regiones metiladas diferencialmente (DMR) que regulan la expresión de genes de la impronta génica. Las tecnologías de reproducción asistida ofrecen oportunidad a aquellas parejas infértiles, sin embargo, tienen el riesgo potencial de transmitir estas alteraciones epigenéticas a su descendencia (112).

#### *Efectos de los metales y plaguicidas*

No hay muchos estudios en relación a este tema, pues el conocimiento en el área es reciente. En animales expuestos a Cd (2 mg/kg/día por 5 días, vía intraperitoneal) se observó una disminución de la fertilidad relacionada con alteraciones epigenéticas en las histonas (113) y la ruptura de la BHT observada en ratones expuestos a este metal (2.5 mg/kg/día durante 2 meses, vía intragástrica) se correlacionó con la hipermetilación del factor nuclear Ya, el cual está implicado en el reclutamiento de proteínas transportadoras que participan en la desintoxicación de xenobióticos (40). Además, en ratones expuestos a Cd (0.9 ppm en el agua de bebida durante 9 semanas) se observaron alteraciones en la metilación de 1788 DMR del espermatozoide relacionadas con genes del desarrollo embrionario (114). Por otro lado, en un estudio en hombres chinos con exposición baja a Pb (concentraciones de Pb en sangre 5 - 10 µg/dL) se observó una hipometilación global del ADN y en regiones promotoras de genes de la vía homeostática del calcio en los espermatozoides, lo que a su vez se relacionó con la disminución en su motilidad (115).

En relación a plaguicidas, el OF metil paratión causó una disminución en la calidad espermática, daño oxidante, daño al ADN y disminución en la fertilización de espermatozoides de ratones expuestos al plaguicida (6 mg/kg/día por 5 días, vía intraperitoneal), y estos efectos podrían estar relacionados con la hipometilación global del ADN e hipermetilación en genes relacionados con la reparación del ADN y la respuesta antioxidante observadas en células germinales masculinas de los ratones expuestos (116).

#### *Efectos multi y transgeneracionales de los metales y plaguicidas*

Un número creciente de factores ambientales, desde la nutrición hasta la exposición a agentes tóxicos pueden alterar el epigenoma de la línea germinal y promover la herencia transgeneracional de epimutaciones (mutaciones en el epigenoma), lo cual incrementa la susceptibilidad para desarrollar enfermedades en generaciones posteriores (117).

#### *Efectos epigenéticos y generacionales de metales y plaguicidas*

Hay pocos estudios que evalúen el efecto multi o transgeneracional por exposición paterna a contaminantes ambientales. Ratas expuestas crónicamente al As en el agua de bebida (1 mg/mL durante 16 semanas) (F0) se aparearon para producir el linaje del As (F1, F2 y F3) y se observó un aumento en el peso de los testículos y el epidídimo, disminución de la calidad espermática, así como el aumento de la fragmentación del ADN en ambos sexos e hipermetilación del ADN en el tejido testicular en las generaciones F2 y F3; estas alteraciones epigenéticas en la vida temprana del individuo pueden estar involucradas con los defectos reproductivos y la salud en general de las generaciones posteriores (118). Por otro lado, en ratas expuestas durante la gestación a Pb (300 mg/L en el agua de bebida) se observó una disminución del peso de los testículos, epidídimos, vesícula seminal y próstata ventral, distorsión de la arquitectura general del epitelio seminífero, disminución del diámetro tubular seminífero y reducción de células germinales de los críos (119).

Los plaguicidas ocasionan alteraciones durante el desarrollo, algunas de ellas a nivel epigenético promoviendo así la herencia transgeneracional de una susceptibilidad mayor a desarrollar enfermedades (120). La exposición a plaguicidas OF como el fenitrotión (20 y 25 mg/kg/ durante los días gestacionales 12-21, vía intragástrica) afectó el peso y la morfología de las gónadas y las glándulas accesorias, afectando así la fertilidad masculina en ratas (121). Se ha observado que la exposición al plaguicida OF clorpirifos en ratas gestantes (1 mg/kg/día durante los días gestacionales 9-12 ó 17-20, vía subcutánea) interfiere con la diferenciación sexual en ambos sexos por la disminución de los niveles de serotonina en ratas (122).

En relación a otros plaguicidas, la exposición al fungicida vinclozolina en ratas gestantes (100 ó 200 mg/kg/día durante los días gestacionales 8-15, vía intraperitoneal) provocó un aumento en la muerte de las células germinales testiculares por apoptosis y disminución de la motilidad espermática que correlacionaron con la alteración de los patrones de metilación del ADN en la línea germinal de la generación F3 (123). Mientras que, en la exposición al herbicida atrazina en ratas gestantes (25 mg/kg/día durante los días gestacionales 8-14, vía intraperitoneal) se presentó una mayor incidencia de tumores mamarios en la generación F2, mientras que, en la generación F3 se presentó pubertad de inicio temprano, alteraciones del comportamiento (hiperactividad motora) y un fenotipo delgado en ambos sexos (124).

## Observaciones finales

Los seres humanos hemos contribuido al aumento de los contaminantes ambientales (metales, plaguicidas, entre otros), algunos de los cuales se encuentran de manera ubicua y son responsables de la aparición de trastornos en la salud reproductiva, lo que conlleva a mediano y largo plazo a la infertilidad masculina que es un problema de salud pública en varios países, incluido México. La presencia de los metales en el ambiente se debe principalmente a fuentes antropogénicas, y en algunos casos, como para el As, por fuentes naturales por el agua del subsuelo. El uso excesivo de plaguicidas y las carentes medidas de seguridad y regulación causan graves riesgos para la salud reproductiva masculina. La mayoría de las personas pueden estar expuestas a más de un contaminante a la vez, por lo cual podrían generarse efectos acumulativos. Algunos metales y plaguicidas pueden tener efectos heredables con consecuencias en la salud y en particular en la reproducción de las futuras generaciones.

Con la información presentada, es urgente incorporar a las nuevas metodologías (sugeridas recientemente por la OMS) para evaluar la función del espermatozoide, incluida la integridad de la cromatina y ADN, así como el daño oxidante, la RA y el estado de metilación del ADN que son mejores predictores de la fertilidad y adecuado desarrollo embrionario. Por lo anterior, sugerimos su inclusión en los análisis de rutina en los laboratorios de andrología y, sobre todo, en las clínicas de fertilidad.

## Referencias

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 Dec 26;13(1):37.
2. Machen GL, Sandlow JI. Causes of Male Infertility. *Male Infertil*. 2020;3-14.
3. ATSDR (Agency of Toxic Substances and Disease Registry). Substance Priority List | ATSDR [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 17]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#>
4. Téllez-Rojo MM, Bautista-Arredondo LF, Trejo-Valdivia B, Cantoral A, Estrada-Sánchez D, Kraiem R, et al. National report of blood lead levels and lead-glazed ceramics use in vulnerable children. *Salud Publica Mex*. 2019;61(6):787-97.
5. Limón-Pacheco JH, Jiménez-Córdova MI, Cárdenas-González M, Sánchez Retana IM, Gonsbatt ME, Del Razo LM. Potential Co-exposure to Arsenic and Fluoride and Biomonitoring Equivalents for Mexican Children. *Ann Glob Heal*. 2018 Jul 27;84(2):257-73.
6. Alarcón-Herrera MT, Bundschuh J, Nath B, Nicolli HB, Gutierrez M, Reyes-Gomez VM, et al. Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis, mobility and remediation. *J Hazard Mater*. 2013 Nov;262:960-9.
7. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 13;0:227.

8. WHO (World Health Organization). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2019 [Internet]. Vol. 1. 2019. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
9. WHO (World Health Organization). The use of DDT in malaria vector control: WHO position statement [Internet]. Geneva PP - Geneva: Global Malaria Programme; 2011. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69945>
10. Chanon KE, Méndez-Galván JF, Galindo-Jaramillo JM, Olguín-Bernal H, Borja-Aburto VH. Cooperative actions to achieve malaria control without the use of DDT. *Int J Hyg Environ Health*. 2003 Jan;206(4-5):387-94.
11. Secretaría del Convenio de Estocolmo. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP). In Estocolmo, Suecia; 2009.
12. Graham AM. A history of pesticides. A history of pesticides. Boston: CABI; 2018. 311 p.
13. Tsvetkov N, Samson-Robert O, Sood K, Patel HS, Malena DA, Gajiwala PH, et al. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* (80- ). 2017 Jun 30;356(6345):1395-7.
14. Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal AS, et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Clean Prod*. 2021 Feb;283:124657.
15. INECC (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático). Elementos Para Desarrollar Una Estrategia Integral Para La Gestión Responsable De Plaguicidas En México. 2019.
16. Timchalk C. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Toxicol Organophosphate Carbamate Compd*. 2006 Jan 1;103-25.
17. ATSDR (Agency of Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile For Lead. 2012.
18. Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. *Reprod Toxicol*. 2006 Feb;21(2):171-8.
19. Moreira FR, Moreira JC. Effects of lead exposure on the human body and health implications. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2004;15(2):119-29.
20. Lafuente A, Márquez N, Pérez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. *Exp Biol Med*. 2001 Jun 29;226(6):605-11.
21. Gad SC. Cadmium. In: *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier; 2014. p. 613-6.
22. Sahnoun AE, Case LD, Jackson SA, Schwartz GG, Schwartz GG. Cadmium and prostate cancer: A critical epidemiologic analysis. Vol. 23, *Cancer Investigation*. Cancer Invest; 2005. p. 256-63.
23. Renu K, Madhyastha H, Madhyastha R, Maruyama M, Vinayagam S, Valsala Gopalakrishnan A. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. *Life Sci*. 2018 Nov;212.
24. ATSDR (Agency of Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile For Arsenic. 2007.

25. Marss TC. Mammalian Toxicology of Insecticides. Marrs T, editor. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2012. 184–195 p. (Issues in Toxicology).
26. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Vol. 575, Science of the Total Environment. *Sci Total Environ*; 2017. p. 525–35.
27. Clavijo RI, Hsiao W. Update on male reproductive endocrinology. *Transl Androl Urol*. 2018 Jul 1;7(S3):S367–72.
28. Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Dec 16;4(1).
29. Ciarrocca M, Capozzella A, Tomei F, Tomei G, Caciari T. Exposure to cadmium in male urban and rural workers and effects on FSH, LH and testosterone. *Chemosphere*. 2013 Feb 1;90(7):2077–84.
30. Ujah GA, Nna VU, Agah MI, Omue LO, Leku CB, Osim EE. Effect of quercetin on cadmium chloride-induced impairments in sexual behaviour and steroidogenesis in male Wistar rats. *Andrologia*. 2018 Mar 1;50(2):e12866.
31. Liu D, Wan J, Liu Z, Zhao Z, Zhang G, Leng Y. Determination of cadmium induced acute and chronic reproductive toxicity with Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci*. 2020 Dec 6;35(9):1919–26.
32. Zhang H, Liu Y, Zhang R, Liu R, Chen Y. Binding Mode Investigations on the Interaction of Lead(II) Acetate with Human Chorionic Gonadotropin. *J Phys Chem B*. 2014 Aug 14;118(32):9644–50.
33. Han Y, Xia Y, Han J, Zhou J, Wang S, Zhu P, et al. The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males. *Chemosphere*. 2008 Jun;72(5).
34. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reprod Toxicol*. 2009 Apr;27(2).
35. Rhouma K Ben, Tébourbi O, Krichah R, Sakly M. Reproductive toxicity of DDT in adult male rats. *Hum Exp Toxicol*. 2001 Aug 2;20(8):393–7.
36. Ronco AM, Valdés K, Marcus D, Llanos M. The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. *Toxicology*. 2001 Feb 21;159(1–2):99–106.
37. Vaithinathan S, Saradha B, Mathur PP. Transient inhibitory effect of methoxychlor on testicular steroidogenesis in rat: an in vivo study. *Arch Toxicol* 2008 8211. 2008 Apr 10;82(11):833–9.
38. Recio R, Robbins WA, Borja-Aburto V, Morán-Martínez J, Froines JR, Hernández RM, et al. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect*. 2001 Dec;109(12):1237–40.
39. Djuric A, Begic A, Gobeljic B, Stanojevic I, Ninkovic M, Vojvodic D, et al. Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol*. 2015 Dec;86:25–33.
40. Fang Y, Xiang Y, Lu X, Dong X, Zhang J, Zhong S. Epigenetic dysregulation of Mdr1b in the blood-testis barrier contributes to dyszoospermia in mice exposed to cadmium. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Mar 1;190:110142.

41. Staessen JA, Nawrot T, Den Hond E, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K, et al. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: A feasibility study of biomarkers. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1660–9.
42. Souza ACF, Marchesi SC, Domingues de Almeida Lima G, Ferraz RP, Santos FC, da Matta SLP, et al. Effects of Sodium Arsenite and Arsenate in Testicular Histomorphometry and Antioxidants Enzymes Activities in Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2016 Jun 7;171(2).
43. Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2018;52(1):84–90.
44. Kenfack G. Effects of propoxur on male fertility in wistar rat exposed neonatally Prevention of emerging zoonoses in Central Africa: an overview from a veterinary perspective View project Hepatitis treatment using natural products View project Effects of propoxur on. *Int J Reprod Contracept Obs Gynecol*. 2014;3(4):898–902.
45. Elsharkawy EE, Yahia D, El-Nisr NA. Chlorpyrifos induced testicular damage in rats: Ameliorative effect of glutathione antioxidant. *Environ Toxicol*. 2014 Sep;29(9):1011–9.
46. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy LK, D'Souza UJA. An organophosphate insecticide methyl parathion (O- O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *J Toxicol Sci*. 2006;31(3):177–89.
47. Ortega-Olvera JM, Winkler R, Quitanilla-Vega B, Shibayama M, Chávez-Munguía B, Martín-Tapia D, et al. The organophosphate pesticide methamidophos opens the blood-testis barrier and covalently binds to ZO-2 in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Dec 1;360:257–72.
48. Urióstegui-Acosta M, Tello-Mora P, Solís-Heredia M de J, Ortega-Olvera JM, Piña-Guzmán B, Martín-Tapia D, et al. Methyl parathion causes genetic damage in sperm and disrupts the permeability of the blood-testis barrier by an oxidant mechanism in mice. *Toxicology*. 2020 May 30;438:152463.
49. Sayim F. Histopathological Effects of Dimethoate on Testes of Rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007 Aug 15;78(6):479–84.
50. Jaiswal A, Parihar VK, Sudheer Kumar M, Manjula SD, Krishnanand BR, Shanbhag R, et al. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2005 Aug;585(1–2):50–9.
51. Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Valette A, Tilloy A, Chevalier S, et al. Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: An early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008 Jan 1;1778(1):56–67.
52. Ye X, Liu J. Effects of pyrethroid insecticides on hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A reproductive health perspective. Vol. 245, *Environmental Pollution*. 2019. p. 590–9.
53. Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, et al. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem Funct*. 2012 Aug;30(6):492–9.

54. Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM, et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*. 2021 Mar 1;53(2):e13874.
55. Tello-Mora P, Hernández-Cadena L, Pedraza J, López-Bayghen E, Quintanilla-Vega B. Acrosome reaction and chromatin integrity as additional parameters of semen analysis to predict fertilization and blastocyst rates. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Oct 19;16(1):1–10.
56. WHO (World Health Organization). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. World Health. Geneva: World Health Organization; 2021.
57. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*. 2000 Mar 1;6(2):107–21.
58. 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.
59. Hernández-Ochoa I, García-Vargas G, López-Carrillo L, Rubio-Andrade M, Morán-Martínez J, Cebrián ME, et al. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol*. 2005 Jul;20(2):221–8.
60. DOF (Diario Oficial de la Federación). Modificación a la NOM-199-SSA1-2000 Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente, publicada el 18 de octubre de 2002. [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 30]. Available from: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5495551&fecha=30/08/2017](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5495551&fecha=30/08/2017)
61. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. Vol. 8, *Interdisciplinary Toxicology*. Slovak Toxicology Society; 2015. p. 55–64.
62. Ranganathan P, Rao KA, Sudan JJ, Balasundaram S. Cadmium effects on sperm morphology and semenogelin with relates to increased ROS in infertile smokers: An in vitro and in silico approach. *Reprod Biol*. 2018 Jun 1;18(2):189–97.
63. Medina MF, Arrieta MC, Villafaña MN, Klyver SMR, Odstrcil IMA, González ME. Early signs of toxicity in testes and sperm of rats exposed to low cadmium doses. *Toxicol Ind Health*. 2017 Jul 20;33(7):576–87.
64. Oliveira H, Spanò M, Santos C, Pereira M de L. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. *Reprod Toxicol*. 2009 Dec 1;28(4):550–5.
65. Da Costa R, Botana D, Piñero S, Proverbio F, Marín R. Cadmium inhibits motility, activities of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and axonemal dynein-ATPase of human spermatozoa. *Andrologia*. 2016 May 1;48(4):464–9.
66. Wang L, Yuhua L, Fu J, Zhen L, Zhao N, Yang Q, et al. Cadmium inhibits mouse sperm motility through inducing tyrosine phosphorylation in a specific subset of proteins. *Reprod Toxicol*. 2016 Aug 1;63:96–106.
67. Hsieh F-I, Hwang T-S, Hsieh Y-C, Lo H-C, Su C-T, Hsu H-S, et al. Risk of Erectile Dysfunction Induced by Arsenic Exposure through Well Water Consumption in Taiwan. *Environ Health Perspect*. 2008 Apr;116(4).
68. 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 Heal A Glob Access Sci Source*. 2012 Dec 9;11(1).
69. Huang Q, Luo L, Alamdar A, Zhang J, Liu L, Tian M, et al. Integrated proteomics and metabolomics analysis of rat testis: Mechanism of arsenic-induced male reproductive toxicity. *Sci Rep*. 2016 Sep 2;6(1).
  70. Momeni HR, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. *Iran J Reprod Med*. 2012 May;10(3).
  71. Kim Y-J, Kim J-M. Arsenic Toxicity in Male Reproduction and Development. *Dev Reprod*. 2015 Dec;19(4):167–80.
  72. Pant N, Shukla M, Upadhyay AD, Chaturvedi PK, Saxena DK, Gupta YK. Association between environmental exposure to p, p'-DDE and lindane and semen quality. *Environ Sci Pollut Res*. 2014 Aug 1;21(18):11009–16.
  73. De Jager C, Farias P, Barraza-Villarreal A, Avila MH, Ayotte P, Dewailly E, et al. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: A cross-sectional study. *J Androl*. 2006 Jan 2;27(1):16–27.
  74. Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, Recio R, Morán-Martínez J, Cebrián ME, et al. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196(1):108–13.
  75. Pérez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, Solís-Heredia MJ, Hernández-Ochoa I, Rojas-García E, et al. PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jul;230(2):261–8.
  76. Hu Y, Zhang Y, Vinturache A, Wang Y, Shi R, Chen L, et al. Effects of environmental pyrethroids exposure on semen quality in reproductive-age men in Shanghai, China. *Chemosphere*. 2020 Apr;245.
  77. Meeker JD, Ryan L, Barr DB, Herrick RF, Bennett DH, Bravo R, et al. The Relationship of Urinary Metabolites of Carbaryl/Naphthalene and Chlorpyrifos with Human Semen Quality. *Environ Health Perspect*. 2004 Dec;112(17):1665–70.
  78. Cissen M, Wely M van, Scholten I, Mansell S, Bruin JP de, Mol BW, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. Drevet JR, editor. *PLoS One*. 2016 Nov 10;11(11):e0165125.
  79. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology*. 2020 Jan 9;8(1):53–81.
  80. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016 Jun;169:56–75.
  81. Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). *Methods Mol Biol*; 2013. p. 147–64.
  82. Sharma R, Masaki J, Agarwal A. Sperm DNA Fragmentation Analysis Using the TUNEL Assay. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). *Methods Mol Biol*; 2013. p. 121–36.
  83. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA Damage Measured by Comet Assay. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). *Methods Mol Biol*; 2013. p. 137–46.

84. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84(4):833–42.
85. Monsefi M, Alaei S, Moradshahi A, Rohani L. Cadmium-induced infertility in male mice. *Environ Toxicol*. 2009 Feb;25(1).
86. Hsu PC, Chang HY, Guo YL, Liu YC, Shih TS. Effect of smoking on blood lead levels in workers and role of reactive oxygen species in lead-induced sperm chromatin DNA damage. *Fertil Steril*. 2009 Apr;91(4):1096–103.
87. Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. Lead Interaction with Human Protamine (HP2) as a Mechanism of Male Reproductive Toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2000 Jul;13(7):594–600.
88. Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Jan 15;202(2):189–98.
89. Urióstegui-Acosta M, Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Piña-Guzmán B, Rafael-Vázquez L, Solís-Heredia MJ, et al. Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;279:391–400.
90. Piña-Guzmán B, Sánchez-Gutiérrez M, Marchetti F, Hernández-Ochoa I, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity after targeting spermatocytes and maturing spermatozoa. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jul;238(2):141–9.
91. Le Blévec E, Muroňová J, Ray PF, Arnoult C. Paternal epigenetics: Mammalian sperm provide much more than DNA at fertilization. Vol. 518, *Molecular and Cellular Endocrinology*. *Mol Cell Endocrinol*; 2020.
92. Salazar-Arredondo E, Solís-Heredia M de J, Rojas-García E, Hernández-Ochoa I, Quintanilla-Vega B. Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reprod Toxicol*. 2008 Aug;25(4):455–60.
93. Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Niderhauser-García A, Ortega-Martínez M, Jaramillo-Rangel G. Multinucleation of spermatozoa and spermatids in infertile men chronically exposed to carbofuran. *Reprod Toxicol*. 2010 Jul;29(4):458–60.
94. Sánchez MC, Alvarez Sedó C, Chaufan GR, Romanato M, Da Cuña R, Lo Nostro F, et al. In vitro effects of endosulfan-based insecticides on mammalian sperm. *Toxicol Res (Camb)*. 2018 Jan 1;7(1):117–26.
95. Radwan M, Jurewicz J, Wielgomas B, Piskunowicz M, Sobala W, Radwan P, et al. The association between environmental exposure to pyrethroids and sperm aneuploidy. *Chemosphere*. 2015 Jun;128:42–8.
96. Xia Y, Cheng S, Bian Q, Xu L, Collins MD, Chang HC, et al. Genotoxic Effects on Spermatozoa of Carbaryl-Exposed Workers. *Toxicol Sci*. 2005 May 1;85(1):615–23.
97. Bashiri Z, Amidi F, Amiri I, Zandieh Z, Maki CB, Mohammadi F, et al. Male Factors: the Role of Sperm in Preimplantation Embryo Quality. *Reprod Sci*. 2021 Jul 2;28(7):1788–811.



98. Lima GD de A, Sertorio MN, Souza ACF, Menezes TP, Mouro VGS, Gonçalves NM, et al. Fertility in male rats: Disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod Toxicol*. 2018 Jun;78:130–40.
99. 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 Aug;25(4):481–4.
100. Zhao X, Cheng Z, Zhu Y, Li S, Zhang L, Luo Y. Effects of paternal cadmium exposure on the sperm quality of male rats and the neurobehavioral system of their offspring. *Exp Ther Med*. 2015 Dec 1;10(6):2356–60.
101. Feychting M, Plato N, Nise G, Ahlbom A. Paternal occupational exposures and childhood cancer. *Environ Health Perspect*. 2001 Feb;109(2):193–6.
102. Godínez-Solís Y, Solís-Heredia M de J, Roa-Espitia A, Parra-Forero LY, Hernández-González EO, Hernández-Ochoa I, et al. Low concentrations of lead decrease the sperm fertilization ability by altering the acrosome reaction in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019 Oct;380:114694.
103. Farag AT, Radwan AH, Eweidah MH, ElMazoudy RH, El-Sebae AE-K. Evaluation of male-mediated reproductive toxic effects of methamidophos in the mouse. *Andrologia*. 2012 Apr;44(2):116–24.
104. Burrueel VR, Raabe OG, Overstreet JW, Wilson BW, Wiley LM. Paternal effects from methamidophos administration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 Jun 1;165(2):148–57.
105. Ramos-Flores Á, Camacho-Hernández I, Sierra-Santoyo A, Solís-Heredia M de J, Verdín-Betancourt FA, Parra-Forero LY, et al. Temephos Decreases Sperm Quality and Fertilization Rate and Is Metabolized in Rat Reproductive Tissues at Low-Dose Exposure. *Toxicol Sci*. 2021 Aug 11;
106. Kim S-H, Bae J-W, Kim D-H, Jeong D-J, Ha JJ, Yi JK, et al. Detrimental effects of temephos on male fertility: An in vitro study on a mouse model. *Reprod Toxicol*. 2020 Sep;96:150–5.
107. Gu Y hua, Li Y, Huang X feng, Zheng J fen, Yang J, Diao H, et al. Reproductive Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on Mouse Sperm Function and Early Embryonic Development In Vitro. Wang H, editor. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e70112.
108. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. Vol. 53, *Andrologia*. Blackwell Publishing Ltd; 2021.
109. Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, et al. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology*. 2015 Mar 1;3(2):235–40.
110. Song B, Wang C, Chen Y, Li G, Gao Y, Zhu F, et al. Sperm DNA integrity status is associated with DNA methylation signatures of imprinted genes and non-imprinted genes. *J Assist Reprod Genet* 2021 388. 2021 Mar 30;38(8):2041–8.
111. Khambata K, Raut S, Deshpande S, Mohan S, Sonawane S, Gaonkar R, et al. DNA methylation defects in spermatozoa of male partners from couples experiencing recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2021;36(1):48–60.
112. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, et al. Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics*

- 2019 111. 2019 Feb 7;11(1):1–12.
113. Li M, Liu C, Yang L, Zhang L, Chen C, He M, et al. G9a-mediated histone methylation regulates cadmium-induced male fertility damage in pubertal mice. *Toxicol Lett.* 2016 Jun 11;252:11–21.
  114. Saintilnord WN, Tenlep SYN, Preston JD, Duregon E, DeRouchev JE, Unrine JM, et al. Chronic Exposure to Cadmium Induces Differential Methylation in Mice Spermatozoa. *Toxicol Sci.* 2021 Apr 12;180(2):262–76.
  115. Zhang T, Ru YF, Wu B, Dong H, Chen L, Zheng J, et al. Effects of low lead exposure on sperm quality and sperm DNA methylation in adult men. *Cell Biosci.* 2021 Jul 30;11(1):1–11.
  116. Hernandez-Cortes D, Alvarado-Cruz I, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Epigenetic modulation of Nrf2 and Ogg1 gene expression in testicular germ cells by methyl parathion exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018 May;346:19–27.
  117. Nilsson EE, Sadler-Riggelman I, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. Vol. 4, *Environmental Epigenetics.* Oxford Academic; 2018. p. 1–13.
  118. Nava-Rivera LE, Betancourt-Martínez ND, Lozoya-Martínez R, Carranza-Rosales P, Guzmán-Delgado NE, Carranza-Torres IE, et al. Transgenerational effects in DNA methylation, genotoxicity and reproductive phenotype by chronic arsenic exposure. *Sci Rep.* 2021 Apr 15;11(1):1–16.
  119. Corpas I, Castillo M, Marquina D, Benito MJ. Lead Intoxication in Gestational and Lactation Periods Alters the Development of Male Reproductive Organs. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002 Oct;53(2):259–66.
  120. Skinner MK. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Dec 1;398(1–2):4–12.
  121. Turner KJ, Barlow NJ, Struve MF, Wallace DG, Gaido KW, Dorman DC, et al. Effects of in Utero Exposure to the Organophosphate Insecticide Fenitrothion on Androgen-Dependent Reproductive Development in the Crl:CD(SD)BR Rat. *Toxicol Sci.* 2002 Jul 1;68(1):174–83.
  122. Aldridge J, Seidler F, Slotkin T. Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environ Health Perspect.* 2004 Feb;112(2):148–55.
  123. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu N, Skinner MK. Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science (80- ).* 2005 Jun 3;308(5727):1466–9.
  124. McBirney M, King SE, Pappalardo M, Houser E, Unkefer M, Nilsson E, et al. Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. Óvilo C, editor. *PLoS One.* 2017 Sep 20;12(9):e0184306.

# IMPACTO DE LA EDAD Y LOS FACTORES CLÍNICOS Y SOCIOAMBIENTALES SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN

Gustavo Luis Verón<sup>1</sup>

Rosa Molina<sup>2</sup>

Mónica Hebe Vazquez-Levin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET)- Fundación IBYME (FIBYME). Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Laboratorio de Andrología y Reproducción (LAR). Córdoba, Argentina.

Autor correspondiente: Dra. Mónica Vazquez-Levin. Correo electrónico: [mhvazl@gmail.com](mailto:mhvazl@gmail.com)

## Generalidades sobre el análisis seminal

La probabilidad de embarazo natural de una pareja durante la fase fértil es del 38% a lo largo de un mes, y escala a 68, 81 y 92% si se considera un lapso de 3, 6 o 12 meses, respectivamente (1). Sin embargo, el éxito de este proceso puede verse afectado por numerosos factores clínicos, ambientales y de estilo de vida que pueden afectar a ambos miembros de la pareja (2). En este sentido, se define a la infertilidad como una enfermedad caracterizada por la incapacidad de concebir naturalmente manteniendo relaciones sexuales regulares sin uso de anticonceptivos en el lapso de 12 meses (3). Esta enfermedad afecta al 15-20% de las parejas en edad reproductiva globalmente, y alrededor del 30% de los casos se debe a factores masculinos, 30% a femeninos y el 40% restante a factores combinados (4,5).

La evaluación de la fertilidad masculina involucra la combinación del análisis exhaustivo de la historia del paciente, salud física general y análisis de laboratorio. Con respecto a este último, el análisis seminal permite obtener información clínicamente relevante sobre la funcionalidad testicular y de glándulas accesorias y la capacidad eyaculatoria (6).

El análisis de rutina incluye la evaluación del volumen seminal, la concentración y cuenta, vitalidad, motilidad total y progresiva (rápida y lenta), y morfología normal espermáticas. Asimismo, el análisis de semen también incluye la determinación de la presencia de otros tipos celulares en el eyaculado (células redondas o peroxidasa-positivas) (7<sup>[1]</sup>). En su Quinta Edición, el manual de la OMS propone un conjunto de estudios especializados, que incluyen la evaluación de espermatozoides osmóticamente competentes (ensayo de hinchazón hipo-osmótica o HOS) y con cromatina compacta como evidencia de una correcta madurez nuclear (test de azul de anilina), y la presencia de anticuerpos anti-espermáticos (ASA) (MAR Test). Asimismo, en esta edición, se presentaron protocolos detallados para estandarizar el análisis seminal, así como se establecieron límites inferiores de referencia (LIR) como puntos de corte para considerar muestras seminales normales o anormales, valores que fueron determinados a partir del análisis de 4500 muestras de

hombres fértiles de 14 países que habían sido padres durante los últimos 12 meses (8,9) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Límite inferior de referencia del Manual de la OMS de 2010.

Parámetro	Límite inferior de referencia (LRL)
Volumen seminal	1,5ml
Concentración espermática	15 millones/ml
Cuenta espermática	39 millones/eyaculado
Motilidad total	40%
Motilidad progresiva	32%
Morfología normal	4%
Vitalidad	58%

Límite inferior de referencia para volumen seminal, concentración espermática, cuenta espermática, motilidad total, motilidad progresiva, morfología normal y vitalidad espermática

Si bien el parámetro de motilidad espermática informa sobre el porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra, no permite describir el movimiento de cada célula. Esta limitación condujo al desarrollo de sistemas computarizados para el análisis de semen, denominados sistemas CASA (del inglés *Computer-Assisted Sperm Analysis*). Este sistema provee una evaluación objetiva y sistemática de la motilidad espermática mediante la integración de dos módulos:

1. Módulo de adquisición de imágenes: consiste en una cámara de video acoplada a un microscopio y conectada a una computadora.
2. Módulo de análisis: consiste en una computadora que analiza las imágenes capturadas mediante algoritmos definidos por cada fabricante.

Los sistemas CASA suministran una serie de parámetros cinemáticos determinados a partir del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide. El centro de la cabeza es definido como el centroide en el sistema de digitalización, lo que permite seguir la trayectoria del espermatozoide a través del tiempo. El centroide es determinado en el primer fotograma del video y su localización es determinada nuevamente en cada fotograma subsiguiente. De esta forma, la determinación de la trayectoria espermática permite estimar una serie de parámetros que describen la cinemática de cada espermatozoide de la muestra. La velocidad espermática se encuentra definida por tres parámetros: la velocidad rectilínea, la velocidad curvilínea y la velocidad promedio. La Velocidad Rectilínea (VSL) es aquella definida a partir de la distancia recorrida por el centroide considerando una trayectoria que une su primera y última posición, formando una línea recta. Por otro lado, la Velocidad Curvilínea (VCL) es definida a partir de la trayectoria real recorrida por el centroide, mientras que la Velocidad Promedio (VAP) es definida a partir de una trayectoria promedio calculada empleando algoritmos específicos de cada fabricante de los equipos CASA.

Teniendo en cuenta las trayectorias definidas para el cálculo de la VCL y VAP, se define a la frecuencia de golpe cruzado (BCF) como la tasa de intersección de estas trayectorias. Asimismo, a partir de los valores de velocidad se pueden calcular parámetros que definen la progresión del movimiento del espermatozoide, y son la Linealidad ( $LIN = VSL/VCL$ ), Rectitud ( $STR = VSL/VAP$ ), y Balanceo ( $WOB = VAP/VCL$ ).

Finalmente, el movimiento de la cabeza se puede describir a través de dos parámetros, la Amplitud del Desplazamiento Lateral de la Cabeza (ALH, promedio de la distancia entre la trayectoria promedio y la cabeza espermática en cada fotograma) y el Desplazamiento Angular Promedio (MAD, ángulo promedio formado entre la trayectoria promedio y la cabeza espermática).

El estudio de los parámetros seminales en su conjunto permite definir la calidad de una muestra de semen, y a nivel poblacional proporciona información sobre tendencias en el tiempo o lugar.

### **Alteraciones en la calidad seminal**

Numerosos estudios concuerdan que, a partir de la primera mitad del 1900, se ha producido un declive en la calidad seminal a nivel mundial, determinándose en particular una disminución de la cuenta espermática de un 3% anual en países europeos y de 1,5% en Estados Unidos (10). Este hecho tiene un correlato con un aumento en la infertilidad masculina durante las últimas décadas (11,12), que ha sido atribuido al menos en parte a la caída de la calidad seminal asociada a diversos factores, entre los que se destacan enfermedades genéticas y endócrinas, y más aún a infecciones, exposición a tóxicos, la edad y cambios medioambientales (13-21). Algunos trabajos han reportado tendencias similares en países de Latinoamérica (22,23). Teniendo ésto en cuenta, es de vital importancia el estudio de asociaciones entre factores de riesgo para la fertilidad y su impacto sobre la calidad seminal. En el presente capítulo se desarrollarán los aportes de estudios recientes sobre la asociación entre la calidad seminal y la edad, condiciones clínicas y factores medioambientales, haciendo especial hincapié en estudios realizados por nuestro grupo de investigación.

### **La edad y la calidad seminal**

Durante las últimas décadas, la paternidad se ha visto postergada en países desarrollados por nuevas generaciones en la búsqueda de seguridad socioeconómica (24). En línea con esto, se ha encontrado una correlación entre la educación universitaria y una mayor tasa de matrimonio y mejor estabilidad profesional y financiera (25,26). En consecuencia, el tiempo necesario para alcanzar estos objetivos ha devenido en una paternidad tardía (27). La edad materna en Dinamarca ha crecido de 29,1 años a 33,4 entre 1986 y 2016 (28), y más de un tercio de los recién nacidos de Inglaterra y Gales tienen padres mayores de 35 años (29).

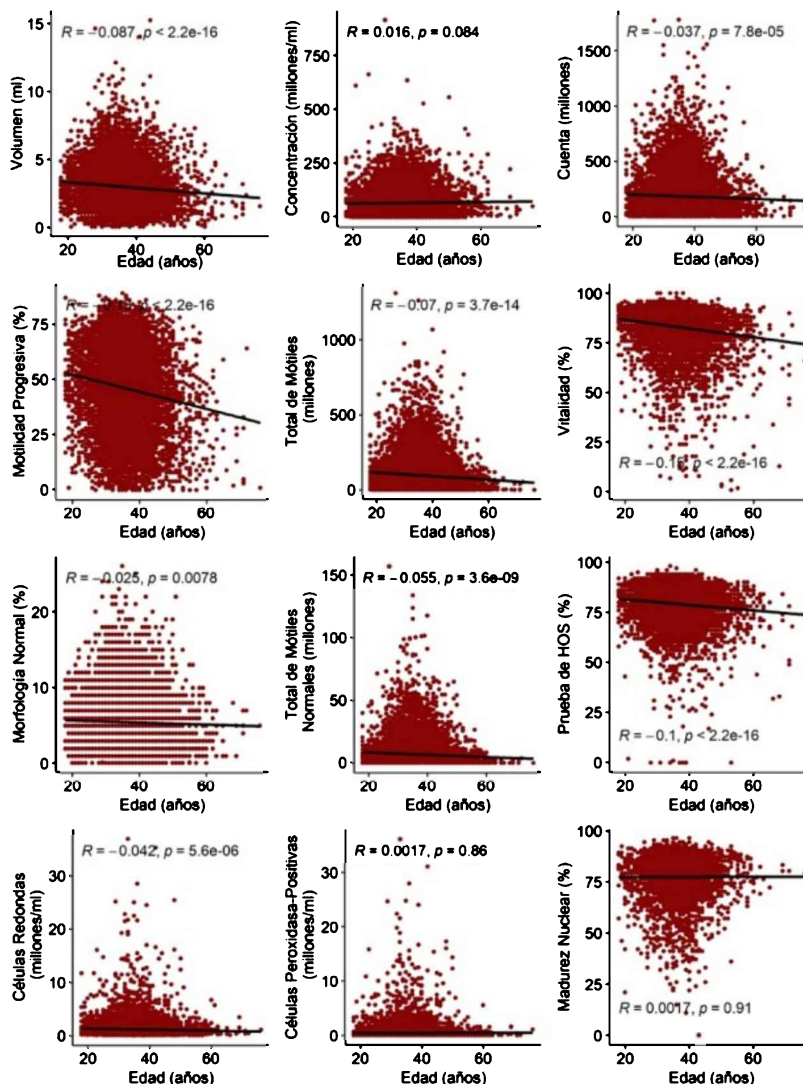
Si bien es conocido el impacto del envejecimiento femenino sobre el potencial fértil, reflejado por una disminución en la reserva ovárica, en la calidad ovocitaria, y alteraciones en la reparación al daño del ADN (30-32), no hay un consenso claro en cuanto al impacto de la edad paterna sobre la calidad seminal. Si bien hay estudios que encuentran una asociación, otros reportan la falta de evidencia (33-36). Sin embargo, existe evidencia de un descenso del potencial fértil en relación con la edad, demostrado por una menor tasa de embarazo utilizando muestras de hombres mayores en procedimientos de reproducción asistida (37-39). Más aún, la fertilidad de hombres mayores de 35 (40) y 45 años (41) se ha encontrado significativamente disminuida en comparación a aquella de menores de 25 años, reflejada como la necesidad de un tiempo mayor para lograr un embarazo. Asimismo, la edad paterna avanzada al momento de la concepción también se relacionó con alteraciones en la salud de la descendencia, evidenciadas por mayores tasas de anomalías congénitas, cognitivas, cáncer de mama, leucemia, autismo, esquizofrenia, trastorno bipolar, y mayores tasas de mutaciones *de novo* (42,43).

En base a estos antecedentes, y la ausencia de informes de Latinoamérica, nuestro equipo de investigación desarrolló un estudio enfocado en evaluar el impacto de la edad sobre la calidad seminal. Para ello contamos con una base de datos de análisis de semen del Laboratorio LAR (Córdoba, Argentina), gentilmente cedida por su directora, la Dra. Rosa Molina.

Sobre esta base de datos se estudió la correlación entre la edad y una serie de parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática. Posteriormente, se determinó un punto de corte para dicotomizar a la población acorde a una edad en la que se evidenciara una caída en la calidad seminal. Para ello se realizaron análisis de comparación de grupos de etarios y análisis mediante curvas ROC.

Acorde a esos resultados, se determinaron las diferencias entre la calidad seminal de poblaciones de menor y mayor edad. Como resultado, en una cohorte de 11657 muestras de semen de pacientes con un promedio de edad de  $35,86 \pm 6,38$  años se encontró una correlación

significativamente negativa entre la edad y la calidad seminal. La misma se evidenció por una disminución en el volumen seminal, motilidad progresiva, vitalidad, morfología normal, prueba de HOS y células redondas, asociada a un incremento de la edad (**Figura 1**).



**Figura 1.** Correlación entre la edad y parámetros seminales de rutina. La edad correlacionó negativamente de forma significativa con el volumen seminal, cuenta espermática, motilidad progresiva, TM, vitalidad, morfología normal, NM, prueba de HOS y concentración de células redondas ( $R$  = Coeficiente de correlación de Pearson, indicado en cada panel junto su P-valor asociado) (Análisis realizado sobre 11657 casos).

Parte de estos resultados se encontraron en concordancia con estudios previos donde se observó una disminución en la motilidad (34,35,44) y la cuenta espermática (35,36) en relación con la edad. Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la concentración espermática, en línea con estudios previos (33,34,44). Por otro lado, la correlación negativa entre la edad y la integridad de la membrana plasmática espermática, medida por la prueba de HOS, resultó de especial interés por el efecto deletéreo de valores anormales de esta prueba sobre el éxito de la implantación embrionaria (45).

Estos resultados condujeron a la búsqueda de un punto de corte etario mediante el análisis de curvas ROC (**Tabla 2**), encontrando puntos de corte que oscilaron entre los 36 y 44 años, con un promedio de  $40,42 \pm 2,70$  años y áreas bajo la curva mayores a 0,5. Estos resultados, en conjunto con las diferencias encontradas entre los grupos etarios separados por décadas, llevaron a la elección de 40 años como punto de corte para estudiar el impacto de la edad sobre la calidad seminal.

**Tabla 2.** Puntos de corte de edad por curvas ROC.

Parámetro	Punto de Corte (años)	Sensibilidad	Especificidad	Área Bajo la Curva
Volumen	36	0,58	0,52	0,56
Concentración	42	0,18	0,84	0,51
Cuenta	42	0,19	0,85	0,52
Motilidad Progresiva	38	0,43	0,66	0,56
Vitalidad	41	0,42	0,81	0,63
Prueba de HOS	40	0,40	0,75	0,59
Morfología Normal	44	0,15	0,90	0,51

Los puntos de corte de edad se encontraron entre 36 y 44 años de edad con una sensibilidad y especificidad entre 0,15 y 0,90.

La comparación de los distintos parámetros de rutina entre grupos de muestras de pacientes mayores y menores de 40 años resultó en el hallazgo de un descenso significativo del volumen seminal, cuenta espermática, motilidad progresiva, total de espermatozoides móviles en el eyaculado, vitalidad, cuenta total de espermatozoides móviles y morfológicamente normales (Cuenta espermática x % de espermatozoides móviles x % morfológicamente normales), e integridad de la membrana plasmática en muestras de pacientes mayores de 40 años en comparación a aquellas de menores de 40 años (46) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Calidad seminal en muestras de hombres menores y mayores de 40 años.

Parámetro	<40 años	≥40 años	P-valor (Mann-Whitney)
n	8832	2825	
Edad	33,20 ± 4,20	44,16 ± 4,65	***
Volumen	3,09 ± 2,51	2,84 ± 1,52	***
Concentración	66,32 ± 60,34	68,65 ± 62,42	ns
Cuenta	186,88 ± 175,77	176,92 ± 178,85	***
Motilidad Progresiva	47,25 ± 18,26	42,57 ± 19,01	***

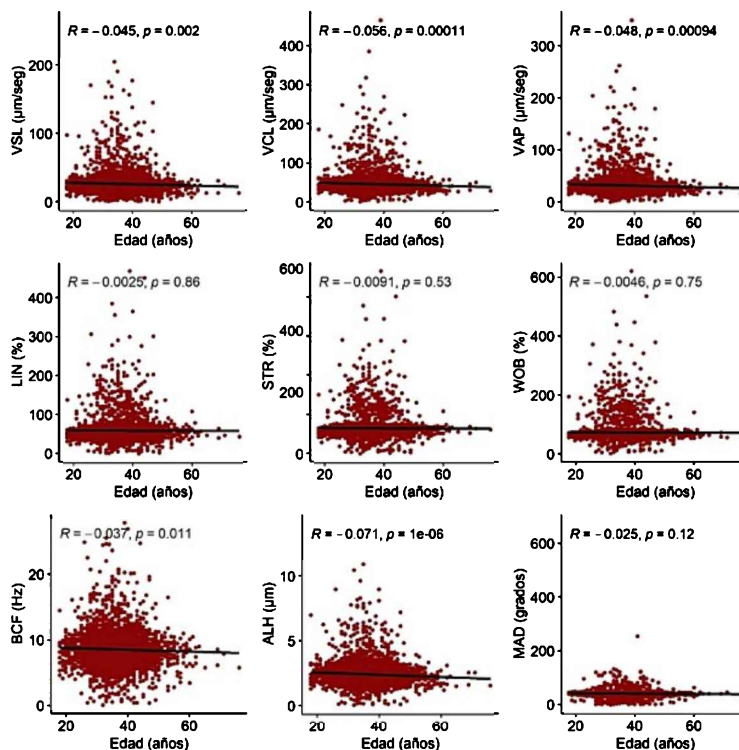
<b>Total de Móviles</b>	100,89 ± 112,16	86,76 ± 105,61	***
<b>Vitalidad</b>	83,83 ± 8,85	81,30 ± 11,07	***
<b>Morfología Normal</b>	5,52 ± 3,47	5,36 ± 3,35	ns
<b>Total de Móviles Normales</b>	7,19 ± 10,75	6,06 ± 9,45	***
<b>Prueba de HOS</b>	79,61 ± 8,41	78,04 ± 8,95	***
<b>Células Redondas</b>	1,24 ± 1,57	1,15 ± 1,49	***
<b>Células Peroxidasa-Positivas</b>	0,44 ± 1,35	0,44 ± 1,26	ns
<b>Madurez Nuclear</b>	77,20 ± 10,60	76,98 ± 11,10	ns
<b>VSL</b>	27,03 ± 15,05	25,63 ± 13,11	***
<b>VCL</b>	47,83 ± 23,12	45,44 ± 15,57	***
<b>VAP</b>	33,16 ± 17,80	31,44 ± 15,15	***
<b>LIN</b>	60,11 ± 25,56	59,90 ± 27,39	ns
<b>STR</b>	85,50 ± 30,50	85,03 ± 30,81	ns
<b>WOB</b>	74,22 ± 31,16	73,90 ± 31,68	ns
<b>BCF</b>	8,64 ± 2,37	8,44 ± 2,33	**
<b>ALH</b>	2,48 ± 0,81	2,37 ± 0,73	***
<b>MAD</b>	42,45 ± 16,08	41,83 ± 11,52	**

Se encontró un menor volumen seminal, cuenta espermática, motilidad progresiva, total de móviles, vitalidad, total de móviles normales, prueba de HOS y concentración de células redondas; VSL, VCL, VAP, BCF, ALH y MAD en muestras de pacientes mayores de 40 años con respecto a aquellas de pacientes menores de 40 años. \*P<0,05 \*P<0,005 \*\*\*P<0,0005 (Prueba de Mann-Whitney).

Si bien no hay un consenso claro sobre cuál es una edad paterna avanzada, se ha utilizado la edad de 40 años como punto de corte en un 44% (14/32) de los reportes incluidos en una revisión reciente del tema (13). Asimismo, se reportaron mayores riesgos de cáncer de mama, leucemia infantil y tumores del sistema nervioso central en hijos de padres de más de 40 años (47). Y en relación con la problemática expuesta, hay reportes que aconsejan limitar la edad de donantes de semen a 40 años (48).

Con respecto a la investigación de la cinemática del espermatozoide, el estudio de los parámetros reveló una correlación negativa y significativa entre la edad y todos los parámetros de velocidad (VSL, VCL y VAP) y frecuencia (BCF) (**Figura 2**).





**Figura 2.** Correlación entre la edad y parámetros de cinemática espermática. La edad correlacionó negativamente de forma significativa con VSL, VCL, VAP, BCF y ALH ( $R$  = Coeficiente de correlación de Pearson, presente en cada panel con su P-valor asociado). (Análisis realizado sobre 4704 casos).

No obstante, no se encontró una asociación significativa entre la edad y parámetros cinemáticos de progresión (LIN, STR, WOB). Con respecto al desplazamiento de la cabeza, su disminución con el aumento de la edad fue evidenciada considerando la distancia (ALH), pero no el ángulo (MAD).

Asimismo, se encontró un descenso significativo en parámetros de velocidad (VSL, VCL y VAP), frecuencia (BCF) y desplazamiento de la cabeza (ALH y MAD) en muestras de pacientes mayores de 40 años (**Tabla 3**) (46).

De igual manera, también se encontró una asociación negativa y significativa entre la cinemática espermática y la edad en una subpoblación no expuesta a factores que impactarían negativamente sobre la calidad seminal, como son la criptorquidia, las infecciones genitales, la obesidad, los tratamientos crónicos, o la exposición a tóxicos (46). En este sentido, la disminución en VSL, VCL, VAP y ALH resulta de especial interés, ya que son parámetros que predicen el éxito de la inseminación intrauterina (49, 50) y fecundación *in vitro* (51,52). En un estudio de una cohorte de 100 pacientes se reportó una disminución en VSL, VAP y LIN, pero ningún efecto sobre VCL, ALH y BCF asociados a la edad (44). Las diferencias entre este reporte y el presente estudio pueden deberse al tamaño poblacional y el sistema CASA utilizado.

Teniendo en cuenta estos resultados, concluimos que la edad es un factor que afecta la calidad seminal per se, por lo que la postergación de la paternidad puede comprometer el potencial fértil masculino.

### La obesidad, la autoinmunidad y la calidad seminal

El crecimiento en la incidencia de la obesidad a nivel global es una causa de preocupación en la salud pública. En el año 2013 la obesidad fue clasificada como una enfermedad por la Asociación Médica Americana (53), y se define a partir de un Índice de Masa Corporal (IMC)  $\geq 30 \text{kg/m}^2$  (54). Si bien es conocido su impacto sobre en la salud general, hay informes que reportan su impacto negativo sobre la salud reproductiva. Específicamente, se encontró una asociación negativa entre

el índice de masa corporal ( $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ ) y la concentración y cuenta espermática (55,56). Por otro lado, la obesidad también se encontró asociada a alteraciones en el perfil hormonal masculino (57-59).

Utilizando la base de datos del laboratorio LAR, estudios de nuestro equipo de investigación revelaron una incidencia de la obesidad del 22,53% en una cohorte de más de 4000 hombres en consulta andrológica. En casos de muestras de pacientes con obesidad, se observó un descenso significativo en la concentración y cuenta espermáticas, en línea con estudios previos que indican una mayor incidencia de oligozoospermia en hombres con obesidad (56). Asimismo, se encontró una asociación positiva y significativa entre el IMC y la edad ( $R=0,13$ ;  $P<2,2 \times 10^{-26}$ ;  $n=4603$  casos).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la sección anterior, al considerar solamente subpoblaciones de pacientes mayores de 40 años, se observó un empeoramiento en la calidad seminal asociado a la obesidad. Entre los parámetros alterados se destacó un menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en muestras de pacientes mayores de 40 años con obesidad (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Parámetros seminales de rutina en muestras de hombres mayores de 40 años con IMC normal u obesidad.

Parámetro	$18 \leq IMC < 25$	$IMC \geq 30$	P-valor (Mann-Whitney)
n	284	306	
Edad	44,03 ± 4,87	43,91 ± 4,26	ns
Volumen	2,87 ± 1,55	2,66 ± 1,54	*
Concentración	97,27 ± 72,47	80,50 ± 68,68	**
Cuenta	250,90 ± 210,97	194,66 ± 183,38	***
Motilidad Progresiva	42,44 ± 17,54	37,71 ± 18,86	**
Total de Móviles	119,93 ± 123,80	83,68 ± 100,96	***
Vitalidad	81,80 ± 10,32	81,96 ± 10,91	ns
Morfología Normal	5,57 ± 3,17	4,60 ± 3,08	***
Total de Móviles Normales	8,17 ± 10,60	5,28 ± 8,72	***
Prueba de HOS	78,67 ± 8,89	79,18 ± 8,86	ns
Células Redondas	1,31 ± 1,76	1,16 ± 1,11	ns
Células Peroxidasa-Positivas	0,51 ± 1,57	0,45 ± 1,01	ns
Madurez Nuclear	77,86 ± 10,77	75,02 ± 12,70	**
VSL	23,45 ± 7,07	23,21 ± 7,28	ns

<b>VCL</b>	43,04 ± 9,30	41,95 ± 10,07	ns
<b>VAP</b>	29,08 ± 6,45	28,47 ± 6,85	ns
<b>LIN</b>	54,28 ± 12,08	55,27 ± 11,64	ns
<b>STR</b>	79,27 ± 11,74	80,28 ± 10,55	ns
<b>WOB</b>	67,77 ± 7,22	68,18 ± 7,38	ns
<b>BCF</b>	8,22 ± 1,84	8,26 ± 1,85	ns
<b>ALH</b>	2,32 ± 0,47	2,27 ± 0,50	ns
<b>MAD</b>	41,45 ± 3,52	41,53 ± 4,28	ns

Se encontró un menor volumen seminal, concentración espermática, cuenta, motilidad progresiva, total de mótiles, morfología normal, total de mótiles normales y madurez nuclear en muestras de pacientes mayores de 40 años con obesidad con respecto a aquellas de pacientes mayores de 40 años con IMC normal. \*P<0,05 \*P<0,005 \*\*\*P<0,0005 (Prueba de Mann-Whitney).

En este sentido, se han descrito factores deletéreos para la morfología espermática asociados a la obesidad, como son el incremento en la temperatura testicular y la generación de un estado proinflamatorio (58,60). Específicamente, la promoción de un estado proinflamatorio conduciría a una mayor generación de especies reactivas del oxígeno, lo que contribuye al daño celular, y se asocia negativamente con la morfología espermática normal (58).

Asimismo, el estado proinflamatorio del testículo también se encuentra asociado a la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos testiculares. Este fenómeno se caracteriza por el ingreso de células del sistema inmunológico (macrófagos, células dendríticas, leucocitos T) hacia el intersticio, lo que conduce a la formación de auto-anticuerpos contra antígenos testiculares, la producción de mediadores proinflamatorios y la desregulación de la esteroidogénesis (61). Entre estos anticuerpos se destacan los anticuerpos antiespermáticos (ASA), dirigidos contra proteínas espermáticas que pueden interferir en la fecundación, conduciendo a la infertilidad inmunológica. Varios estudios han descrito la relación entre la presencia de ASA y alteraciones en parámetros seminales de rutina, encontrando una disminución ASA-dependiente de la motilidad (62-65) e integridad de la membrana plasmática (66,67).

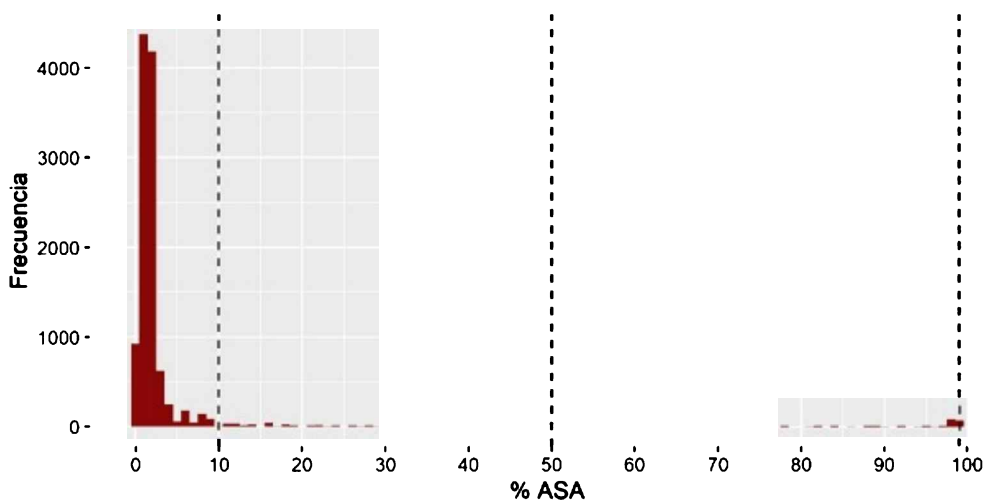
Los antígenos espermáticos tienen la particularidad de expresarse luego de la selección negativa de linfocitos B y T. Sin embargo, existen mecanismos que contribuyen a prevenir el desarrollo de una respuesta inmune contra estos antígenos dados por el control inmunológico ejercido por el testículo. En primer lugar, la barrera hemato-testicular conformada por uniones estrechas entre las células de Sertoli provee una compartimentalización física entre las células germinales y los vasos sanguíneos, reduciendo la inducción de una respuesta inmune adquirida. Por otro lado, las células inmunes presentes en el espacio intersticial disminuyen la tasa de presentación antigénica por sus propiedades inmunorreguladoras (68).

Asimismo, el plasma seminal recibe un gran aporte de inmunoglobulinas del plasma sanguíneo, y tiene una proporción similar de inmunoglobulinas a aquella del plasma (69). Sin embargo, también existe una producción propia de inmunoglobulinas, evidenciado por la presencia de IgM, que no puede trasvasarse desde el plasma (70,71).

En consecuencia, cualquier alteración en el fino equilibrio de la inmunoregulación testicular puede conducir a la inducción de autoinmunidad contra los espermatozoides. En humanos se ha reportado la asociación entre la presencia de ASA y la obstrucción del tracto genital en pacientes con ausencia u obstrucción del vaso deferente, fibrosis quística (72-76), y epididimitis aguda (77). Más aún, también se observó presencia de ASA en pacientes con criptorquidia (78,79), cáncer testicular (80) o sometidos a cirugía (81). El daño físico de la barrera hemato-testicular, consecuencia de torsión, cirugía o trauma testicular conduce al desarrollo de un ambiente inflamatorio donde los antígenos espermáticos son expuestos al sistema inmunológico, induciendo así la producción de ASA (82-84).

Los métodos de evaluación de ASA recomendados por la OMS son el MAR test (Mixed Antiglobulin Reaction) y el IB test (ImmunoBead Test) (7). En ambos casos se determinó un punto de corte del 50% de espermatozoides móviles con ASA como clínicamente relevante. En consecuencia, hay reportes que informan una incidencia del 5-39% en hombres consultando por infertilidad en distintas poblaciones a lo largo del mundo (85-93). Esta variedad en los reportes es explicada en parte por la heterogeneidad de los tamaños poblacionales incluidos en cada estudio, la diversidad de métodos utilizados para evaluar la presencia de ASA y sobre todo el punto de corte considerado para definir a una muestra como ASA-positiva (revisiones recientes que recapitulan los estudios en la temática: (94,95).

Considerando el impacto deletéreo de la presencia de ASA sobre la calidad seminal, nuestro equipo de investigación realizó un estudio retrospectivo con el objetivo de determinar el efecto de la presencia de ASA sobre una serie de parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática. Para ello se determinó la incidencia de ASA considerando los puntos de corte del 10 y 50% descriptos en la literatura (7,95), y del 99% para considerar muestras enriquecidas en ASA. Por otro lado, se estudió la asociación entre el porcentaje de espermatozoides ASA-positivos y alteraciones en parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática. Por último, se clasificó a la población como ASA-positiva y ASA-negativa para estudiar los niveles de los distintos parámetros de calidad seminal en cada subgrupo. En el presente estudio se utilizaron datos de estudios realizados empleando el MAR Test en 11657 muestras, lo que reduce la variabilidad entre pruebas y contribuye a la reproducibilidad del ensayo. Los registros fueron obtenidos de la base datos del laboratorio LAR. Como resultado, se determinó una incidencia de 6,78%, 3,47% y 0,64% considerando los puntos de corte del 10%, 50% o 99%, respectivamente (**Figura 3**).



**Figura 3.** Frecuencia de anticuerpos anti-espermáticos. Histograma con la frecuencia de cada porcentaje de anticuerpos anti-espermáticos en una población de 11657 muestras de pacientes. Líneas punteadas: Puntos de corte del 10, 50 y 99%.

Estos resultados se encuentran dentro del rango hallado en otros estudios, donde la presencia de ASA fue determinada como positiva considerando el 40% (incidencia del 5% para 312 casos (87), o 6,3% para 750 casos (88) o el 10% como puntos de corte (incidencia del 6% para 650 casos (92). En contraste, otros reportes indican una incidencia mayor, de alrededor del 9% (9,01% para 111 casos (90) y 9,4% para 1228 casos (67) utilizando un punto de corte del 20%. Estas diferencias pueden deberse, en parte, a la causa de la consulta en el laboratorio de andrología. Específicamente, en los trabajos mencionados, las poblaciones de estudio presentaron bajos porcentajes de pacientes normozoospermicos. Por el contrario, en el presente trabajo se contó con un 57,5% de muestras de pacientes normozoospermicos en la población general analizada.

Los resultados de este estudio también revelaron alteraciones en varios parámetros seminales asociados a la presencia de ASA (punto de corte del 50%), reflejados en el descenso significativo de parámetros de cantidad (concentración espermática, cuenta, cuenta de móviles y cuenta de móviles morfológicamente normales), motilidad progresiva y viabilidad (vitalidad e integridad de la membrana plasmática determinada por la prueba de HOS; (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Parámetros seminales de rutina y cinemática espermática en poblaciones ASA-positivas y ASA-negativas (50%).

Parámetro	Muestras ASA-negativas	Muestras ASA-positivas	P-valor (Mann-Whitney)
n	11253	404	
Volumen	3,03 ± 1,51	2,99 ± 1,50	ns
Concentración	67,47 ± 61,10	50,42 ± 50,99	***
Cuenta	186,03 ± 176,93	140,87 ± 169,23	***
Motilidad Progresiva	46,34 ± 18,45	39,83 ± 20,27	***
Total de Móviles	98,60 ± 111,06	65,93 ± 97,18	***
Vitalidad	83,26 ± 9,46	82,06 ± 10,46	*
Morfología Normal	5,48 ± 3,45	5,44 ± 3,14	ns
Total de Móviles Normales	7,00 ± 10,53	4,42 ± 7,82	***
Prueba de HOS	79,30 ± 8,53	76,76 ± 9,67	***
Células Redondas	1,22 ± 1,56	1,08 ± 1,20	**
Células Peroxidasa-Positivas	0,44 ± 1,34	0,43 ± 1,02	ns
Madurez Nuclear	77,13 ± 10,77	77,68 ± 8,98	ns
VSL	26,74 ± 14,14	23,86 ± 18,48	***
VCL	47,22 ± 21,85	46,62 ± 33,88	ns
VAP	32,76 ± 16,94	30,74 ± 23,62	***
LIN	60,21 ± 26,64	54,40 ± 30,72	***
STR	85,52 ± 30,41	80,41 ± 35,72	***
WOB	74,23 ± 31,14	71,00 ± 36,30	***
BCF	8,61 ± 2,35	7,82 ± 2,57	***
ALH	2,45 ± 0,79	2,34 ± 1,03	*
MAD	42,29 ± 15,07	41,99 ± 12,87	ns

La presencia de ASA (punto de corte del 50%) se encontró asociada a una menor concentración, cuenta, motilidad progresiva, total de móviles, vitalidad, total de móviles normales, prueba de HOS, concentración de células redondas, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF y ALH. \*P<0,05 \*\*P<0,005 \*\*\*P<0,0005 (Prueba de Mann-Whitney).

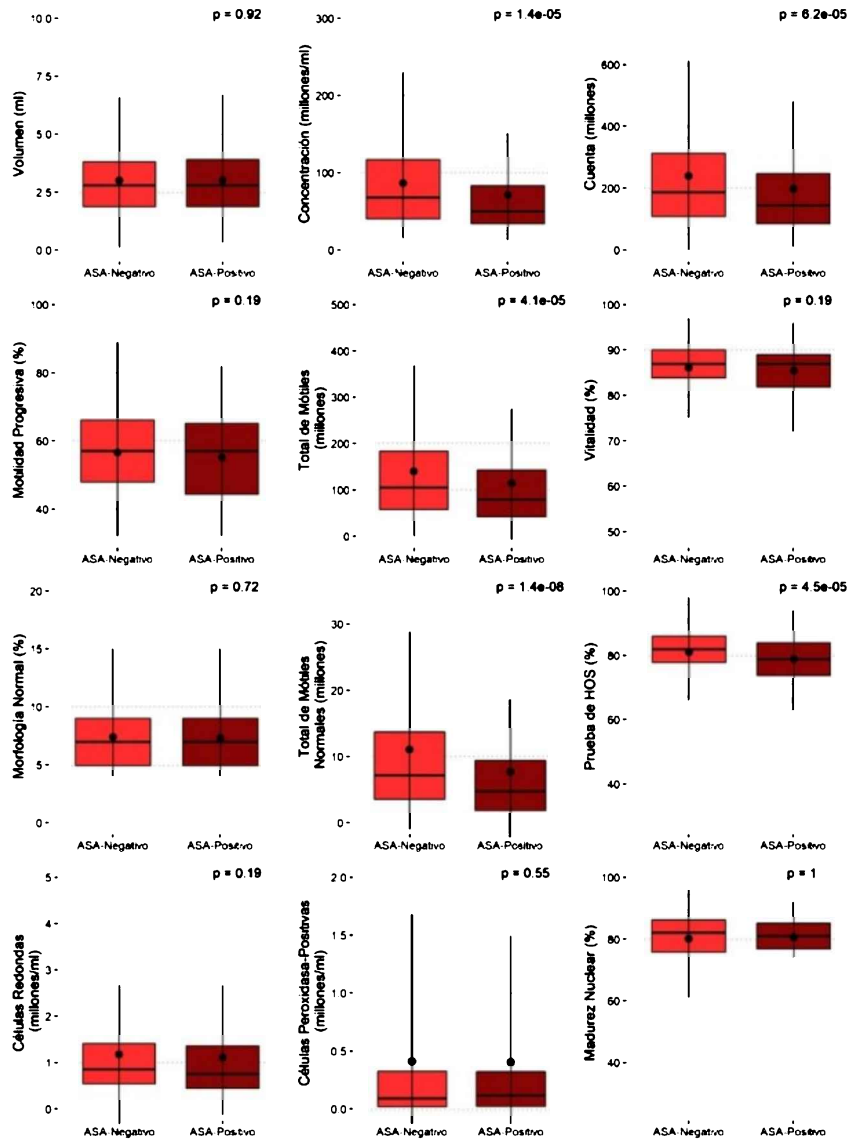
Estos hallazgos concuerdan con reportes previos que describen una reducción en la concentración espermática y motilidad progresiva asociada a la presencia de ASA en 1167 casos, considerando los lineamientos propuestos por la OMS en 1999 para el análisis del semen (94). En este sentido, la disminución ASA-dependiente de la concentración espermática y la motilidad progresiva se encontró asociada a alteraciones en la espermatogénesis (85), aglutinación (86,96) y lisis celular (97). Esto resulta de especial interés, dado que los valores más bajos de motilidad progresiva, cuenta espermática y total de espermatozoides móviles se encontraron en subgrupos ASA-positivos definidos por el punto de corte más extremo (99%).

Con respecto al descenso del porcentaje de espermatozoides osmóticamente competentes en muestras ASA-positivas, Rossato y colaboradores (67) encontraron asociaciones similares en una cohorte de alrededor de 1200 casos evaluados utilizando el MAR Test directo. Asimismo, la presencia de ASA fue asociada a valores anormales en pruebas de estrés espermático (MOST), proponiéndose una relación entre estas anomalías y defectos en la membrana plasmática espermática (92). Adicionalmente, en casos de tratamiento con corticosteroides para disminuir la presencia de ASA se observó una asociación negativa entre los valores de la prueba de HOS y el porcentaje de ASA (98). Resultados de nuestro equipo evidenciaron alteraciones en la integridad de la membrana plasmática no solo en muestras de la población general, sino también en una subpoblación normozoospermica (concentración espermática, motilidad progresiva y morfología normales). Si bien se encontró una correlación negativa tanto entre el porcentaje de ASA y vitalidad espermática y competencia osmótica, al considerar el punto de corte del 50% para clasificar a una muestra como ASA-positiva se encontró una diferencia de más del 200% en la caída de la vitalidad (83,26% vs. 82,06%; delta = 1,2%) en comparación a los resultados de la prueba de HOS (79,30% vs. 76,76%, delta = 2,54%), lo que sugeriría que la presencia de ASA podría ejercer un impacto negativo sobre la funcionalidad de la membrana, más que sobre la vitalidad espermática *per se*. En este sentido, se ha reportado un impacto negativo de ASA sobre la fluidez de la membrana plasmática espermática y la consecuente expresión de ciertos receptores por su efecto sobre el contenido de colesterol (99). De forma similar, se encontró una reducción en la tasa de reacción acrosomal y un menor aumento de calcio asociado a este proceso tras la incubación de espermatozoides con ASA en condiciones hipo-osmóticas (67).

El uso del sistema CASA permitió identificar cambios en la cinemática espermática asociada a la presencia de ASA (**Tabla 5**).

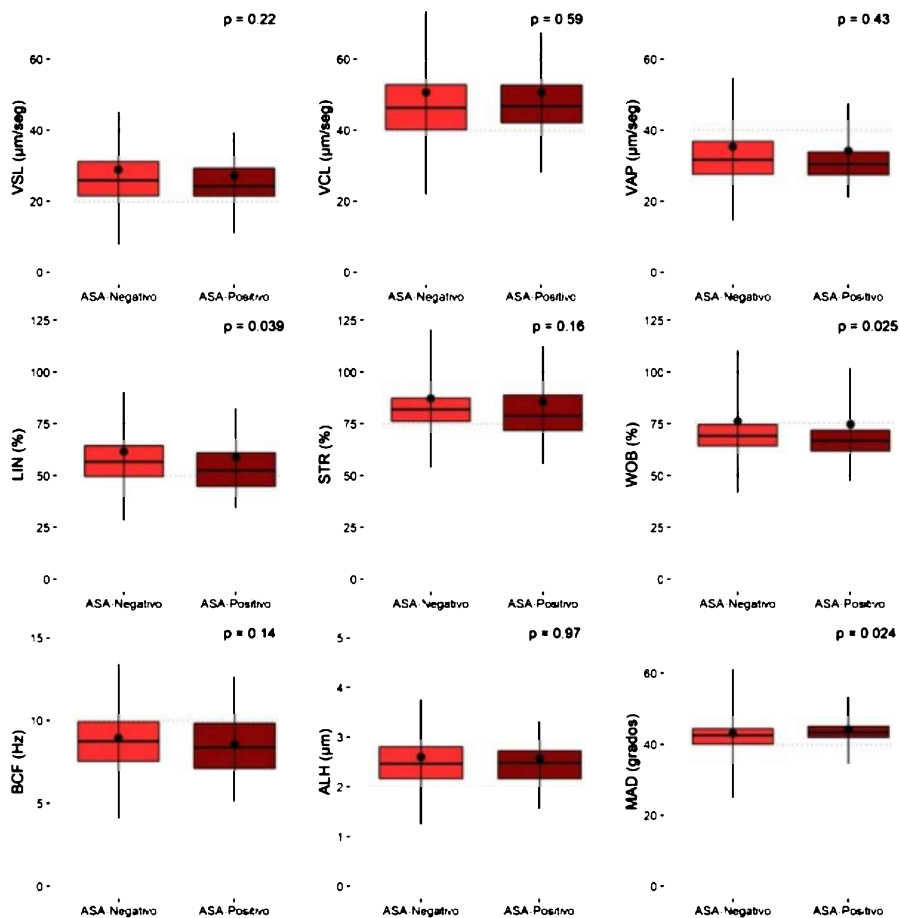
La caída del 6,51% en la motilidad progresiva en muestras ASA-positivas (ASA-negativa:  $46,34 \pm 18,45\%$ ; ASA-positiva:  $39,83 \pm 20,27\%$ ; punto de corte del 50%) fue acompañada de un descenso significativo en los parámetros de cinemática espermática VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF y ALH. En línea con estos resultados, Check y colaboradores (100) reportaron un descenso en LIN en muestras ASA-positivas evaluadas con el sistema CASA CellSoft (punto de corte del 50%; n ASA-positivas = 24; n ASA-negativas = 204). La caída en parámetros de cinemática espermática también estuvo sujeta al porcentaje de ASA, dado el descenso significativo observado para VSL, VAP, LIN y STR en muestras ASA-positivas definidas por el punto de corte del 99% en comparación a aquellas definidas por el 10%. Estos resultados sugieren un efecto deletéreo no solo de la presencia de ASA, sino en altos porcentajes sobre la cinemática espermática.

La presencia de ASA también fue determinada en 6700 muestras de pacientes normozoospermicos. En este caso, se observó un descenso significativo de la concentración y cuenta espermática, cuenta de móviles y móviles morfológicamente normales en muestras ASA-positivas independientemente del punto de corte utilizado (**Figura 4**).



**Figura 4.** Parámetros seminales de rutina en muestras ASA-positivas (50%) y ASA-negativas de una población normozoospermica. Los gráficos de violín representan la distribución de los valores de los parámetros de cinemática espermática en muestras ASA-positivas y ASA-negativas. La presencia de ASA se encontró asociada a una menor concentración y cuenta espermática, TM, NM y prueba de HOS (Prueba de Mann-Whitney).

Por otro lado, aquellas muestras ASA-positivas definidas a partir de los puntos de corte del 50 o 99% también exhibieron un descenso significativo en parámetros de cinemática espermática (LIN, WOB y MAD para 50%; **Figura 5**; LIN y STR para 99%).



**Figura 5.** Parámetros cinemáticos en muestras ASA-positivas (50%) y ASA-negativas de una población normozoospermica. Los gráficos de violín representan la distribución de los valores de los parámetros de cinemática espermática en muestras ASA-positivas y ASA-negativas. La presencia de ASA se encontró asociada a una menor LIN, WOB y MAD (Prueba de Mann-Whitney).

En conjunto, los resultados de este análisis describen la incidencia de ASA en una población de hombres en consulta por infertilidad y en una población de pacientes normozoospermicos. Asimismo, se encontró un efecto deletéreo de la presencia de ASA sobre parámetros de cantidad, motilidad, viabilidad y cinemática espermática. Más aún, su efecto resultó independiente de otras anomalías seminales, dado que se encontró un efecto negativo sobre la calidad seminal en muestras de pacientes normozoospermicos, pudiendo esto estar enmascarando una causa de infertilidad inmunológica.

### Los factores del clima

El impacto de la temperatura sobre la calidad seminal ha sido tema de estudio en varios modelos animales, dado el carácter termo-dependiente de la espermatogénesis. Entre ellos, estudios en ratones encontraron un efecto deletéreo en el aumento de la temperatura escrotal sobre la calidad espermática, evidenciado como un descenso en la cuenta espermática, peso testicular y tamaño de camada (101,102). Por otro lado, estudios en toros encontraron una relación negativa entre la calidad seminal y la temperatura escrotal y testicular (103).

Con respecto a humanos, la temperatura escrotal en hombres vestidos es mantenida alrededor de 3°C por debajo de la temperatura corporal, y cubre un rango de 34,5°C durante el día hasta 35,5°C durante la noche (104), pudiendo descender hasta 30°C en el hombre desnudo (105). En este caso, un aumento de la temperatura escrotal puede conducir al arresto espermático, resultando en un descenso de la cuenta espermática (106).

El aumento en la temperatura escrotal humana está ligado a numerosos factores, entre los que se destacan condiciones clínicas, estilos de vida y hábitos (107). Con respecto al primero, se

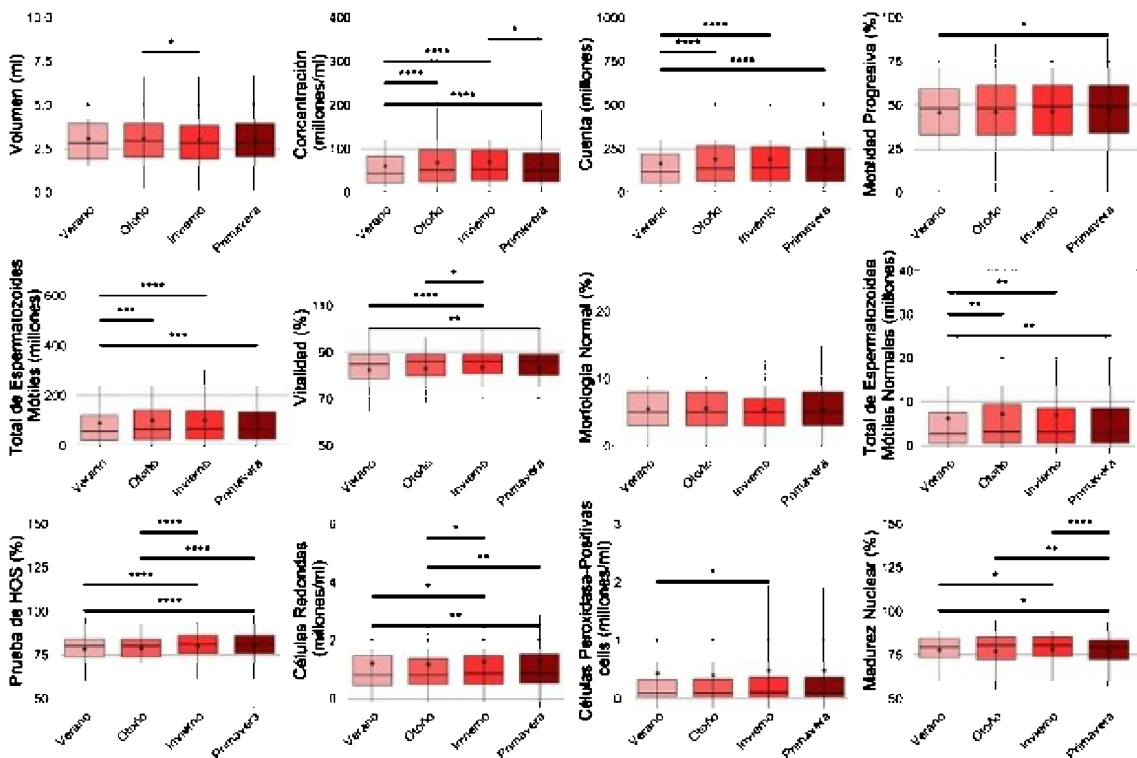


ha reportado una mayor temperatura escrotal en hombres con varicocele u obesidad en comparación con hombres sanos, y dicho aumento se encontró asociado a un descenso en la cuenta espermática, motilidad y morfología normal (108). Por otro lado, el uso de laptops y ropa interior ajustada, y la conducción de vehículos también se relacionaron a una mayor temperatura escrotal (109-112) Con respecto a los hábitos, el uso frecuente de saunas con temperaturas superiores a los 80°C se relacionó a un descenso en la cuenta espermática, motilidad, condensación de la cromatina y funcionalidad mitocondrial (113).

Sumado a los factores mencionados anteriormente, estudios poblacionales de distintas áreas geográficas reportaron variaciones estacionales en la calidad seminal y en la fertilidad masculina (114-120). En muchos casos estas alteraciones fueron interpretadas como la consecuencia de las altas temperaturas veraniegas (121-123), pero cada vez es mayor la evidencia de la asociación entre la calidad seminal y otros factores ambientales. Específicamente, se ha reportado que la heliofanía, definida como la cantidad de horas de luz durante un día, se asocia negativamente con la concentración de inhibina B, marcador de espermatogénesis (124). Más aún, la heliofanía también fue negativamente asociada a distintos marcadores de calidad seminal (115,122,123).

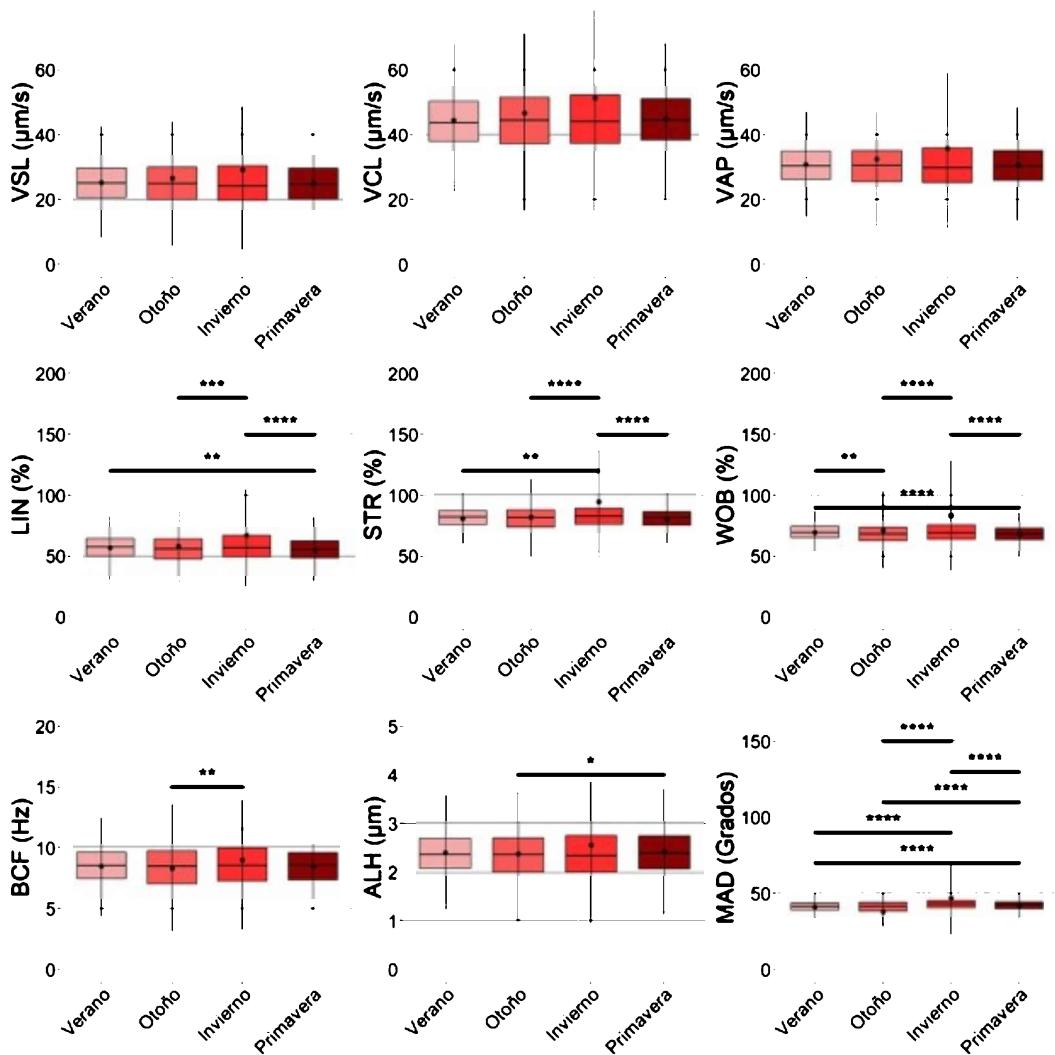
Considerando estos antecedentes, nuestro equipo de investigación estudió las variaciones en la calidad seminal durante las cuatro estaciones del año en la región de Córdoba, Argentina. Posteriormente, se determinaron una serie de factores climáticos de espermatogénesis, considerando el lapso de este proceso en la especie humana. De esta forma se determinó la correlación entre estos factores climáticos durante espermatogénesis y parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática. La relevancia de cada parámetro fue determinada mediante algoritmos de selección de predictores para definir aquellos más relevantes en la definición de la calidad seminal asociada a distintas condiciones climáticas (125).

Para determinar el impacto del clima sobre los parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática, se definieron cuatro grupos estacionales con las muestras de pacientes colectadas durante las distintas estaciones del año. Como resultado, la mayor parte de los parámetros seminales se encontraron significativamente alterados entre muestras obtenidas en invierno y verano para concentración espermática, cuenta, TM, vitalidad, NM, prueba de HOS, células redondas, células peroxidasa-positivas y madurez nuclear (**Figura 6**).



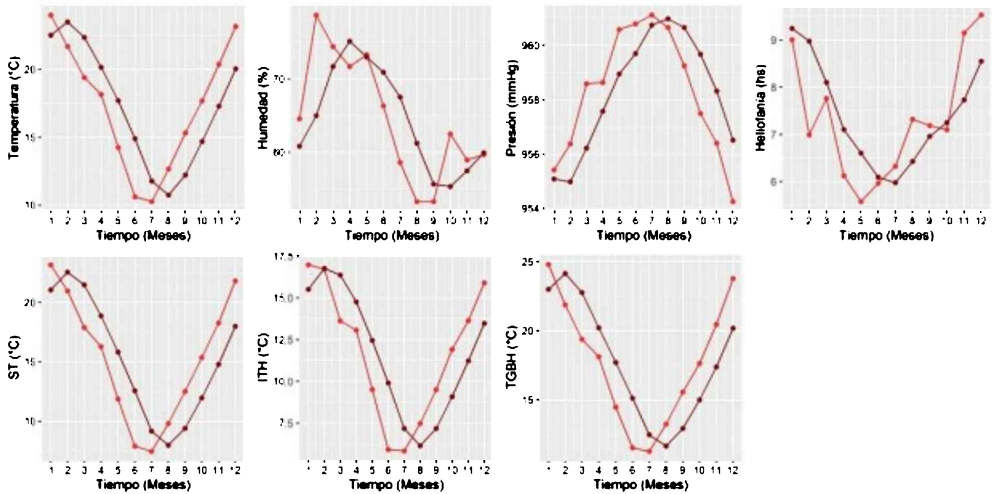
**Figura 6.** Análisis estacional de parámetros seminales de rutina. Se encontraron valores significativamente menores de concentración espermática, cuenta, TM, vitalidad, NM, prueba de HOS, células redondas, células peroxidasa-positivas y madurez nuclear en el verano en comparación al invierno. \*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005; \*\*\*\*P<0,0001 (Prueba de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn).

Por otro lado, las mayores diferencias en parámetros de cinemática espermática se encontraron entre invierno y primavera, evidenciado por la disminución primaveral de LIN, STR, WOB y MAD (Figura 7).



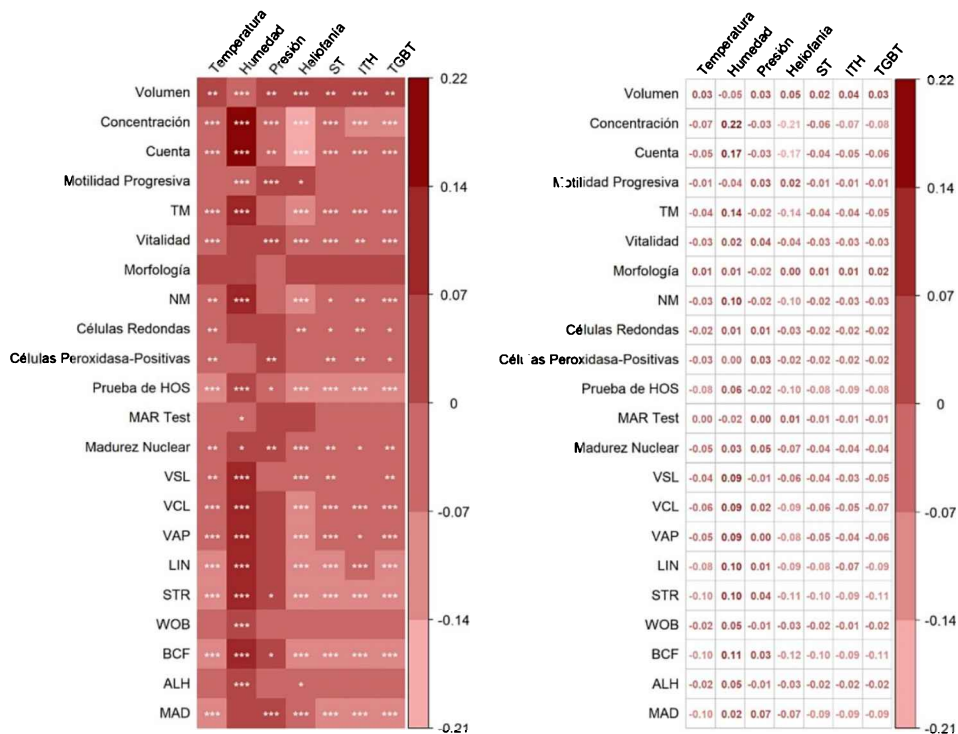
**Figura 7.** Análisis estacional de parámetros seminales de rutina. Se encontraron valores significativamente menores de LIN, STR, WOB y MAD en la primavera en comparación al invierno. \*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005; \*\*\*\*P<0,0001 (Prueba de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn).

Considerando que las estaciones del año dependen de la revolución de la Tierra alrededor del Sol y de la inclinación de su eje con respecto al plano de revolución (126), y que los cambios en los distintos factores climáticos dependen de la radiación recibida en la superficie del planeta que varía a lo largo del año, se estudió el impacto de las variaciones climáticas sobre la calidad seminal. Dado que la espermatogénesis humana comprende alrededor de 74 días (127), se calcularon los factores climáticos correspondientes al lapso definido para el proceso de espermatogénesis (factores de espermatogénesis). Específicamente, se calculó el promedio de los valores registrados durante los 74 días previos para temperatura, humedad, presión, heliofanía (horas de luz solar diarias detectables mediante un heliofanógrafo), sensación térmica (ST), índice de temperatura y humedad (ITH) y temperatura global de bulbo húmedo (TGBH). De esta forma, a cada fecha comprendida entre enero de 2010 y diciembre de 2016 le correspondió un valor de factores climáticos diarios, y un valor de factores climáticos de espermatogénesis (Figura 8).



**Figura 8.** Distribución de factores climáticos a lo largo del año. Promedio de temperatura, humedad, presión, heliofanía, ST, ST, ITH y TGBH durante los años 2010 y 2016 (promedio  $\pm$  desvío estándar). En rojo: factores climáticos diarios. En bordó: factores climáticos de espermatogénesis. Los 12 meses del año se expresaron en números. ST: Sensación Térmica; ITH: Índice de Temperatura y Humedad; TGBH: Temperatura Global de Bulbo Húmedo. Se encontraron picos para la temperatura, heliofanía, ST, ITH y TGBH de espermatogénesis entre enero y febrero. Por otro lado, los valores máximos de presión y humedad se encontraron en abril y agosto, respectivamente.

Como primer abordaje para determinar la asociación entre los factores climáticos mencionados y la calidad seminal, se estudió la correlación de los distintos factores climáticos y los parámetros seminales de rutina y de cinemática espermática mediante un análisis de correlación. Como resultado, se encontró una correlación positiva entre la mayoría de los parámetros seminales y la humedad y presión. Por el contrario, la temperatura, heliofanía, ST, ITH y TGBH correlacionaron negativamente con la calidad seminal. Estos resultados son sintetizados en una matriz de correlación (**Figura 9**), donde los tonos bordó muestran una correlación positiva, los rosas negativa, y los asteriscos muestran la significancia determinada por correlación de Pearson.



**Figura 9.** Matrices de correlación entre factores climáticos y parámetros seminales de rutina y cinemática espermática. Se encontró una correlación negativa entre la temperatura, heliofanía, ST, ITH y TGBH y la calidad seminal (casillas rosas en el

panel izquierdo). Contrariamente, se encontró una correlación positiva entre la mayoría de los parámetros seminales y la humedad y presión (casillas bordó en el panel izquierdo). En el panel de la derecha puede observarse el coeficiente de correlación de Pearson (Análisis realizado sobre 11607 casos).

Sin embargo, este tipo de abordajes no permite seleccionar al factor climático que mejor predice cada parámetro seminal. Con tal propósito, se empleó un algoritmo de aprendizaje automático, el algoritmo de ramificación y poda (128,129), que permite seleccionar un modelo de regresión múltiple donde el agregado de predictores (factores climáticos en este caso) depende de la mejora en la predicción. Asimismo, este algoritmo permitió identificar aquel factor más relevante en cada caso. En consecuencia, la humedad resultó ser el mejor predictor de estos valores determinado mediante algoritmos de toma de decisiones y análisis de regresión. Sin embargo, los reportes de estudios de humedad son escasos, y su estudio está limitado al impacto sobre la salud humana asociada a enfermedades respiratorias como el asma, neumonía, y enfermedades pulmonares obstructivas (129-130). Dado que la humedad relativa varía en función del contenido de vapor de agua y de la temperatura del aire, varios estudios en animales han reportado su evaluación en conjunto con la temperatura (131-133). Con respecto a la salud reproductiva masculina, se ha reportado un aumento en la incidencia de torsión testicular asociada a valores bajos de humedad (134). En el caso de nuestra investigación, se encontró una correlación positiva entre la humedad y la concentración, cuenta, TM, NM, prueba de HOS, madurez nuclear, y casi todos los parámetros de cinemática espermática. Asimismo, se encontraron valores significativamente alterados entre poblaciones expuestas a valores altos (Cuartil 4: 70,15-83,47%; n = 2916) y bajos (Cuartil 1: 44,20-57,72%; n = 2915) de humedad (**Tabla 6**). Si bien la bibliografía es escasa, estos resultados coinciden con reportes previos que describen la correlación positiva entre la humedad y la concentración espermática en pavos (135).

**Tabla 6.** Calidad seminal en períodos extremos de heliofanía.

Parámetro	Baja Humedad	Alta Humedad	P-valor (Mann-Whitney)
n	2915	2916	
Humedad	52,52 ± 3,97	77,10 ± 3,50	***
Volumen	3,15 ± 1,54	2,89 ± 1,51	***
Concentración	50,37 ± 40,97	87,16 ± 71,04	***
Cuenta	146,51 ± 129,37	230,26 ± 205,12	***
Motilidad	47,35 ± 17,87	44,96 ± 18,76	***
TM	78,79 ± 83,67	119,73 ± 129,58	***
Vitalidad	83,23 ± 9,34	83,80 ± 9,06	*
Morfología	5,36 ± 3,38	5,46 ± 3,39	ns
NM	5,39 ± 8,02	8,27 ± 12,10	***
Prueba de HOS	78,56 ± 8,21	80,33 ± 8,40	***
Madurez Nuclear	75,41 ± 10,00	77,40 ± 11,12	***
VSL	26,37 ± 9,92	29,13 ± 19,03	ns
VCL	46,32 ± 9,63	50,83 ± 29,60	ns

VAP	32,24 ± 35,69	35,69 ± 22,95	ns
LIN	56,67 ± 11,58	64,82 ± 35,75	ns
STR	80,73 ± 10,22	90,59 ± 41,66	ns
BCF	8,55 ± 1,65	8,85 ± 2,85	ns
WOB	69,65 ± 7,19	79,92 ± 43,07	ns
ALH	2,51 ± 0,50	2,55 ± 1,00	ns
MAD	41,16 ± 3,71	43,00 ± 21,12	*

La concentración espermática, cuenta, TM, vitalidad, NM, prueba de HOS, madurez nuclear y MAD resultaron significativamente aumentadas en períodos de mayor humedad. Contrariamente, se encontró un descenso significativo en el volumen seminal. \*P<0,05 \*\*P<0,005 \*\*\*P<0,0005 (prueba de Mann-Whitney).

Como contrapartida, se encontró una correlación significativamente negativa entre la mayor parte de los parámetros seminales estudiados y la temperatura, heliofanía, ST, ITH y TGBT. En este caso, la heliofanía fue determinada como el mejor predictor. Tras dicotomizar a la población de estudio acorde a períodos de menor (Cuartil 1: 3,60-6,27hs; n = 2917) y mayor (Cuartil 4: 8,15-10,32hs; n = 2899) heliofanía, se encontró un descenso significativo en la concentración, cuenta, TM, vitalidad, NM, prueba de HOS, madurez nuclear, VSL, VAP, WOB, ALH y MAD asociado a períodos de mayor heliofanía (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Calidad seminal en períodos extremos de heliofanía.

Parámetro	Corta Heliofanía	Larga Heliofanía	P-valor (Mann-Whitney)
n	2917	2899	
Heliofanía	5,59 ± 0,61	8,90 ± 0,54	***
Volumen	2,92 ± 1,47	3,08 ± 1,54	***
Concentración	88,75 ± 74,23	75,23 ± 50,65	***
Cuenta	236,80 ± 210,96	155,52 ± 154,31	***
Motilidad	45,62 ± 18,76	46,45 ± 18,04	ns
TM	124,59 ± 135,44	83,14 ± 98,27	***
Vitalidad	83,94 ± 8,90	82,77 ± 9,81	***
Morfología	5,47 ± 3,34	5,47 ± 3,55	ns
NM	8,70 ± 12,72	5,83 ± 9,41	***
Prueba de HOS	80,63 ± 7,93	78,26 ± 9,03	***
Madurez Nuclear	78,00 ± 10,96	77,13 ± 10,06	**
VSL	28,42 ± 19,50	25,85 ± 7,34	**
VCL	50,21 ± 30,39	45,05 ± 9,54	ns

VAP	35,01 ± 23,57	31,41 ± 6,81	*
LIN	64,36 ± 34,48	57,30 ± 11,19	ns
STR	90,64 ± 42,43	81,19 ± 9,80	ns
BCF	8,75 ± 2,90	8,51 ± 1,62	ns
WOB	79,78 ± 44,01	69,97 ± 7,16	*
ALH	2,50 ± 1,03	2,45 ± 0,49	*
MAD	43,46 ± 21,62	40,84 ± 3,65	***

La concentración espermática, cuenta, TM, vitalidad, NM, prueba de HOS, madurez nuclear, VSL, VAP, WOB, ALH y MAD resultaron significativamente disminuidas en períodos de mayor heliofanía. \*P<0,05 \*\*P<0,005 \*\*\*P<0,0005 (prueba de Mann-Whitney).

Estas asociaciones resultaron de especial interés, porque si bien en humanos no hay una regulación hormonal fotoperiódica clara, sí se observan variaciones en características de comportamiento sexual, como son la frecuencia del coito, la tasa de enfermedades de transmisión sexual y la venta de anticonceptivos (136-140). Asimismo, y si bien los humanos no son reproductores estacionales, lo que significa que son sexualmente activos a lo largo de todo el año (141), sí se observa un pico de testosterona en épocas de menor heliofanía (otoño/invierno; 139,142,143), y un pico de 6-sulfatoximelatonina (metabolito de melatonina) a principios del invierno (142). Esto es destacable en el sentido que la melatonina es uno de los mayores reguladores de la actividad testicular, y cuya síntesis en la glándula pineal depende de señales lumínicas capturadas por fotorreceptores de la retina (138). Esta transducción de señales ha sido propuesta como un mecanismo importante en la regulación hormonal del fotoperíodo en primates como el mono Rhesus, que se apareja durante la época de menor heliofanía. Más aún, todos los elementos necesarios para dicha respuesta estacional al fotoperíodo encontrada en monos también están presente en humanos (141).

En conjunto, estos resultados indican que la calidad seminal de una gran cohorte de pacientes en consulta andrológica en la región de Córdoba, Argentina, se vio afectada negativamente por la edad avanzada, obesidad, presencia de ASA, y períodos de mayor heliofanía o menor humedad durante el año. Este efecto se vio reflejado no solo en parámetros que hacen referencia a la producción y viabilidad espermáticas, predictores de la tasa de embarazo tras inseminación intrauterina (144), sino también en cuanto a la cinemática espermática, asociada tanto al éxito de la inseminación intrauterina (49,50), como al de la fecundación *in vitro* (51,52). Contribuciones futuras de estudios similares podrán reforzar estos hallazgos para asistir en el establecimiento de guías para el asesoramiento y tratamiento de pacientes con intención de concebir.

## Referencias

1. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod* (2003) 18:1959–1966.
2. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* (2013) 11:66.
3. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* (2002) 360:151-9.
4. Centola GM. Semen assessment. *Urol Clin North Am* (2014) 41:163–7.
5. Chu KY, Patel P, Ramasamy R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol* (2019) 29:267–71.
6. Haidl G. New WHO-reference limits-revolution or storm in a teapot?. *Asian J Androl* (2011) 13:208–11.

7. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. Geneva, Switzerland. ISBN: 978 92 4 154778 9
8. Alshahrani S, Aldossari K, Al-Zahrani J, Gabr AH, Henkel R, Ahmad G. Interpretation of semen analysis using WHO 1999 and WHO 2010 reference values: Abnormal becoming normal. *Andrologia* (2018) 50.
9. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. (2010)163:231-45.
10. Sengupta P, Borges E Jr, Dutta S, Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum Exp Toxicol* (2018) 37:247-255.
11. Winters BR & Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am* (2014) 41:195-204.
12. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs* (2016) 25:S35-40.
13. Ramasamy R, Chiba K, Butler P, Lamb DJ. Male Biological Clock: a Critical Analysis of Advanced Paternal Age. *Fertil Steril* (2015) 103:1402-6.
14. Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian J Androl* (2015) 17:948-53.
15. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. (2017) 23:646-659.
16. Krausz C & Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* (2018) 15:369-84.
17. Lymperi S, Giwercman A. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism* (2018) 86:79-90.
18. Jenkins TG, Aston KI, Carrell DT. Sperm epigenetics and aging. *Transl Androl Urol* (2018) 7:S328-S335.
19. Marcho C, Oluwayiose OA, Pilsner JR. The preconception environment and sperm epigenetics. *Andrology* (2020).
20. Vahidi S, Moein MR, Yazdinejad F, Ghasemi-Esmailabad S, Narimani N. Iranian temporal changes in semen quality during the past 22 years: A report from an infertility center. *Int J Reprod Biomed*. (2020) 18:1059-1064.
21. Lv MQ, Ge P, Zhang J, Yang YQ, Zhou L, Zhou DX. Temporal trends in semen concentration and count among 327 373 Chinese healthy men from 1981 to 2019: a systematic review. *Hum Reprod*. (2021) 36:1751-1775.
22. Siqueira S, Ropelle AC, Nascimento JAA, Fazano FAT, Bahamondes LG, Gabiatti JR, Costa-Paiva L, Baccaro LF. Changes in seminal parameters among Brazilian men between 1995 and 2018. *Sci Rep*. (2020) 10:6430.
23. Rosa-Villagrán L, Barrera N, Montes J, Riso C, Sapiro R. Decline of semen quality over the last 30 years in Uruguay. *Basic Clin Androl*. (2021) 31:8.
24. van Roode T, Sharples K, Dickson N, Paul C. Life-Course Relationship between Socioeconomic Circumstances and Timing of First Birth in a

- Birth Cohort. *PLoS One* (2017) 12:e0170170.
25. Torr BM. The Changing Relationship between Education and Marriage in the United States, 1940–2000. *J Fam Hist* (2011) 36:483–503.
  26. Hout M. Social and Economic Returns to College Education in the United States. *Annu Rev Sociol* (2012) 38:379–400.
  27. Mills M, Rindfuss RR, McDonald P, te Velde E. ESHRE Reproduction and Society Task Force. Why Do People Postpone Parenthood? Reasons and Social Policy Incentives. *Hum Reprod Update* (2011) 17:848–60.
  28. Statistik Banken, 2017
  29. Office for National Statistics, 2017
  30. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocr Rev* (2009) 30:465–93.
  31. Bianchi S, Macchiarelli G, Micara G, Linari A, Boninsegna C, Aragona C, Rossi G, Cecconi S, Nottola SA. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:1343–58.
  32. Titus S, Stobezki R, Oktay K. Impaired DNA Repair as a Mechanism for Oocyte Aging: Is It Epigenetically Determined? *Semin Reprod Med* (2015) 33:384–8.
  33. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of Male Age on Semen Quality and Fertility: a Review of the Literature. *Fertil Steril* (2001) 75:237–48.
  34. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The Correlation between Male Age, Sperm Quality and Sperm DNA Fragmentation in 320 Men Attending a Fertility Center. *J Assist Reprod Genet* (2009) 26:41–6.
  35. Stone BA, Alex A, Werlin LB, Marrs RP. Age Thresholds for Changes in Semen Parameters in Men. *Fertil Steril* (2013) 100:952–8.
  36. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* (2015) 19:22–33.
  37. Klonoff-Cohen HS, Natarajan L. The Effect of Advancing Paternal Age on Pregnancy and Live Birth Rates in Couples Undergoing In Vitro Fertilization or Gamete Intrafallopian Transfer. *Am J Obstet Gynecol* (2004) 191:507–14.
  38. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT Jr. Male Age Negatively Impacts Embryo Development and Reproductive Outcome in Donor Oocyte Assisted Reproductive Technology Cycles. *Fertil Steril* (2008) 90:97–103.
  39. Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal Age and Reproduction. *Hum Reprod Update* (2010) 16:65–79.
  40. Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod.* (2000) 15:1703–8.
  41. Hassan MA, Killick SR. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril.* (2003) 79 Suppl 3:1520–7.
  42. Goriely A, Wilkie AO. Paternal Age Effect Mutations and Selfish Spermatogonial Selection: Causes and Consequences for Human Disease. *Am J Hum Genet* (2012) 90:175–200.



43. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. (2021) 488:471-5.
44. Slotter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. Quantitative Effects of Male Age on Sperm Motion. *Hum Reprod* (2006) 21:2868-75.
45. Check JH, Aly J. Sperm with an Abnormal Hypo-osmotic Swelling Test - Normal Fertilization, Normal Embryo Development, but Implantation Failure. *Clin Exp Obstet Gynecol* (2016) 43:319-27.
46. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Beltramone F, Estofan G, Molina RI, Vazquez-Levin MH Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril* (2018) 110:68-75.
47. Yip BH, Pawitan Y, Czene K. Parental Age and Risk of Childhood Cancers: a Population-Based Cohort Study from Sweden. *Int J Epidemiol* (2006) 35:1495-503.
48. Toriello HV, Meck JM; Professional Practice and Guidelines Committee. Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age. *Genet Med*. (2008) 10:457-60.
49. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki M. Prediction of Pregnancy by Intrauterine Insemination Using CASA Estimates and Strict Criteria in Patients with Male Factor Infertility. *Int J Androl* (2004) 27:63-8.
50. Youn JS, Cha SH, Park CW, Yang KM, Kim JY, Koong MK, Kang IS, Song IO, Han SC. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clin Exp Reprod Med*. (2011) 38:47-52.
51. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet*. (2001) 18:213-8.
52. Yuan P, Zhang Z, Luo C, Quan S, Chu Q, Zhao S. Computer-assisted sperm analysis for assessing sperm mobility parameters in in vitro fertilization. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* (2013) 33:448-50.
53. Fryhofer SA, Chair. Is Obesity a Disease? (Resolution 115-A-12) Report of the Council on Science and Public Health. CSAPH Report 3-A-13. AMA House of Delegates 2013 Annual Meeting.
54. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* (2019) 92:6-10.
55. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* (2004) 82:863-70.
56. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, Van Wely M, Cao J, Martini AC, Eskandar M, Chavarro JE, Koloszar S, Twigt JM, Ramlau-Hansen CH, Borges E Jr, Lotti F, Steegers-Theunissen RP, Zorn B, Polotsky AJ, La Vignera S, Eskenazi B, Tremellen K, Magnusdottir

- EV, Fejes I, Hercberg S, Lévy R, Czernichow S. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* (2013) 19:221-31.
57. Best D, Bhattacharya S. Obesity and fertility. *Horm Mol Biol Clin Investig* (2015) 24:5-10.
  58. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol* (2017) 27:441-5.
  59. Leisegang K, Henkel R, Agarwal A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *Am J Reprod Immunol* (2019) 82:e13178.
  60. Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, Sandlow JI, Jarvi KA. Influence of Increasing Body Mass Index on Semen and Reproductive Hormonal Parameters in a Multi-institutional Cohort of Subfertile Men. *Fertil Steril* (2016) 106:1070-5.
  61. Lustig L, Guazzone VA, Theas MS, Pleuger C, Jacobo P, Pérez CV, Meinhardt A, Fijak M. Pathomechanisms of Autoimmune Based Testicular Inflammation. *Front Immunol.* (2020) 11:583135.
  62. Barratt CL, Havelock LM, Harrison PE, Cooke ID. Antisperm antibodies are more prevalent in men with low sperm motility. *Int J Androl* (1989) 12:110-6.
  63. Menge AC & Beitner O. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* (1989) 51:486-92.
  64. Dimitrov DG, Urbánek V, Zvěřina J, Madar J, Nouza K, Kinský R. Correlation of asthenozoospermia with increased antisperm cell-mediated immunity in men from infertile couples. *J Reprod Immunol* (1994) 27:3-12.
  65. Cookson MS, Witt MA, Kimball KT, Grantmyre JE, Lipshultz LI. Can semen analysis predict the presence of antisperm antibodies in patients with primary infertility? *World J Urol* (1995) 13:318-22.
  66. Sinton EB, Riemann DC, Ashton ME. Antisperm antibody detection using concurrent cytofluorometry and indirect immunofluorescence microscopy. *Am J Clin Pathol* (1991) 95:242-6.
  67. Rossato M, Galeazzi C, Ferigo M, Foresta C. Antisperm antibodies modify plasma membrane functional integrity and inhibit osmosensitive calcium influx in human sperm. *Hum Reprod* (2004) 19:1816-20.
  68. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. The immune privilege of the testis. En: "Immune infertility: The impact of immune reactions on human infertility" Krause W, Naz RK. Berlin: Springer (2009). Páginas: 69-77.
  69. Moldoveanu Z, Huang WQ, Kulhavy R, Pate MS, Mestecky J. Human male genital tract secretions: both mucosal and systemic immune compartments contribute to the humoral immunity. *J Immunol* (2005) 175:4127-36.
  70. Shai S & Naot Y. Identification of human sperm antigens reacting with antisperm antibodies from sera and genital tract secretions. *Fertil Steril* (1992) 58:593-8.
  71. Auer J, Senechal H, De Almeida M. Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. *J Reprod Immunol* (1997) 34:121-36.
  72. Patrizio P, Moretti-Rojas I, Ord T, Balmaceda J, Silber S, Asch RH. Low incidence of sperm antibodies in men with congenital absence of the vas

- deferens. *Fertil Steril* (1989) 52:1018-21.
73. D'Cruz OJ, Haas GG, Jr., de La Rocha R, Lambert H. Occurrence of serum antisperm antibodies in patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* (1991) 56:519-27.
  74. Bronson RA, O'Connor WJ, Wilson TA, Bronson SK, Chasalow FI, Droesch K. Correlation between puberty and the development of autoimmunity to spermatozoa in men with cystic fibrosis. *Fertil Steril.* (1992) 58:1199-204.
  75. Matsuda T, Muguruma K, Horii Y, Ogura K, Yoshida O. Serum antisperm antibodies in men with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy. *Fertil Steril* (1993) 59:1095-7.
  76. Vazquez-Levin MH, Kupchik GS, Torres Y, Chaparro CA, Shtainer A, Bonforte RJ, Nagler HM. Cystic fibrosis and congenital agenesis of the vas deferens, antisperm antibodies and CF-genotype. *J Reprod Immunol* (1994) 27:199-212.
  77. Ingerslev HJ, Walter S, Andersen JT, Brandenhoff P, Eldrup J, Geerdsen JP, et al. A prospective study of antisperm antibody development in acute epididymitis. *J Urol* (1986) 136:162-4.
  78. Kurpisz M, Havryluk A, Nakonechnyj A, Chopyak V, Kamieniczna M. Cryptorchidism and long-term consequences. *Reprod Biol* (2010) 10:19-35.
  79. Jiang H & Zhu WJ. Cryptorchidism is not a risk factor for antisperm antibody production in post-orchidopexy males with infertility. *Urol Int* (2013) 90:470-4.
  80. Höbarth K, Klingler HC, Maier U, Kollaritsch H. Incidence of antisperm antibodies in patients with carcinoma of the testis and in subfertile men with normogonadotropic oligoasthenoteratozoospermia. *Urol Int* (1994) 52:162-5.
  81. Ozturk U, Ozdemir E, Dede O, Sagnak L, Goktug HN, Gurbuz OA, et al. Assessment of anti-sperm antibodies in couples after testicular sperm extraction. *Clin Invest Med* (2011) 34:E179-83.
  82. Tung KSK & Menge AC. Sperm and testicular autoimmunity. En: "The Autoimmune Diseases". Rose NR, Mackay IR. New York: Academic (1985). Páginas 537-90.
  83. Heidenreich A, Bonfig R, Wilbert DM, Strohmaier WL, Engelmann UH. Risk factors for antisperm antibodies in infertile men. *Am J Reprod Immunol* (1994) 31:69-76.
  84. Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, Srougi M. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl* (2007) 28:528-32.
  85. Handelsman DJ, Conway AJ, Radonic I, Turtle JR: Prevalence, testicular function and seminal parameters in men with sperm antibodies. *Clin Reprod Fertil* (1983) 2:39-45.
  86. Clarke GN, Elliott PJ, Smaila C. Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *Am J Reprod Immunol Microbiol* (1985) 7:118-23.
  87. Comhaire FH, Hinting A, Vermeulen L, Schoonjans F, Goethals I. Evaluation of the direct and indirect mixed antiglobulin reaction with latex particles for the diagnosis of immunological infertility. *Int J Androl* (1988) 11:37-44.

88. Sinisi AA, Di Finizio B, Pasquali D, Scurini C, D'Apuzzo A, Bellastella A. Prevalence of antisperm antibodies by SpermMAR test in subjects undergoing a routine sperm analysis for infertility. *Int J Androl.* (1993) 16:311-4.
89. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, YoungLai EV. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* (1993) 8:592-8.
90. Vazquez-Levin MH, Notrica JA, Polak de Fried E. Male immunologic infertility: sperm performance on in vitro fertilization. *Fertil Steril* (1997) 68:675-81.
91. Calamera JC, Doncel GF, Brugo-Olmedo S, Sayago A, Acosta AA. Male antisperm antibodies: association with a modified sperm stress test and lipid peroxidation. *Andrologia* (2002) 34:63-8.
92. Al-Daghistani HI, Hamad AW, Abdel-Dayem M, Al-Swaifi M, Abu Zaid M: Antisperm antibody, and fructose levels among Jordanian males with a history of infertility. *Biochem Res Int* (2010) 2010:409640.
93. Bozhedomov VA, Nikolaeva MA, Ushakova IV, Lipatova NA, Bozhedomova GE, Sukhikh GT. Functional deficit of sperm and fertility impairment in men with antisperm antibodies. *J Reprod Immunol* (2015) 112:95-101.
94. Cui D, Han G, Shang Y, Liu C, Xia L, Li L, Yi S. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* (2015) 444:29-36.
95. Vazquez-Levin MH, Marin-Briggiler CI, Veaute C, Molina R, Verón GL. Usefulness of antisperm antibodies testing. En "Practical Guide to Sperm Analysis". Garrido N & Rivera R (Eds). Taylor & Francis Group, CRC Press (2017). Capítulo 12.
96. Kunathikom S, Worasatit C, Toongsuwan S. Relationship between the direct mixed antiglobulin reaction (MAR) test and spontaneous sperm agglutination in men from infertile couples. *J Med Assoc Thai* (1995) 78:89-93.
97. London SN, Haney AF, Weinberg JB. Diverse humoral and cell-mediated effects of antisperm antibodies on reproduction. *Fertil Steril* (1984) 41:907-12.
98. Omu AE, al-Qattan F, Abdul Hamada B. Effect of low dose continuous corticosteroid therapy in men with antisperm antibodies on spermatozoal quality and conception rate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* (1996) 69:129-34.
99. Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Mandel FS, Rosenfeld DL. Antisperm antibody binding to human sperm inhibits capacitation induced changes in the levels of plasma membrane sterols. *Am J Reprod Immunol.* (1993) 30:113-30.
100. Check JH, Adelson HG, Bollendorf A. Effect of antisperm antibodies on computerized semen analysis. *Arch Androl* (1991) 27:61-3.
101. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* (1997) 18:294-301.
102. Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* (2006) 18:647-653.
103. Brito LF, Silva AE, Barbosa RT, Kastelic JP. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal,

- testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* (2004) 61:511-528.
104. Lerchl A, Keck C, Spiteri-Grech J, Nieschlag E. Diurnal variations in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment. *Int J Androl* (1993) 16:195-200.
  105. Bedford JM. The epididymis re-visited: a personal view. *Asian J Androl* (2015) 17:693-698.
  106. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online* (2015) 30:14-27.
  107. Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol* (2007) 5:15.
  108. Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M, Bertoldo A, Foresta C. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Hum Reprod* (2015) 30:1006-1013.
  109. Bujan L, Daudin M, Charlet JP, Thonneau P, Mieusset R. Increase in scrotal temperature in car drivers. *Hum Reprod* (2000) 15:1355-1357.
  110. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* (2005) 20:452-455.
  111. Jung A, Leonhardt F, Schill WB, Schuppe HC. Influence of the type of undertrousers and physical activity on scrotal temperature. *Hum Reprod* (2005) 20:1022-1027.
  112. Jung A, Strauss P, Lindner HJ, Schuppe HC. Influence of heating car seats on scrotal temperature. *Fertil Steril* (2008) 90:335-339.
  113. Garolla A, Torino M, Sartini B, Cosci I, Patassini C, Carraro U, Foresta C. Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Hum Reprod* (2013) 28:877-885.
  114. Spira A. Seasonal variations of sperm characteristics. *Arch Androl* (1984) 12:23-28.
  115. Levine RJ. Seasonal variation of semen quality and fertility. *Scand J Work Environ Health* (1999) 25:34-37; discussion 76-78.
  116. Gyllenborg J, Skakkebaek NE, Nielsen NC, Keiding N, Giwercman A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Int J Androl* (1999) 22:28-36.
  117. Zhang XZ, Liu JH, Sheng HQ, Wu HJ, Wu Y, Yao KS, Lu JC, Zhang FB. Seasonal variation in semen quality in China. *Andrology* (2013) 1:639-643.
  118. Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Har-Vardi I. Seasonal variations of human sperm cells among 6455 semen samples: a plausible explanation of a seasonal birth pattern. *Am J Obstet Gynecol* (2013) 208:406 e1-6.
  119. De Giorgi A, Volpi R, Tiseo R, Pala M, Manfredini R, Fabbian F. Seasonal variation of human semen parameters: A retrospective study in Italy. *Chronobiol Int* (2015) 32:711-716.
  120. Ozelci R, Yılmaz S, Dilbaz B, Akpınar F, Akdag Cırık D, Dilbaz S, Ocal A. Seasonal variation of human sperm cells among 4,422 semen samples: A retrospective study in Turkey. *Syst Biol Reprod Med.* (2016) 62:379-386.

121. Sood S, Reghunandanan R, Singh U, Reghunandanan V, Singh PI. Circannual variation of sperm count and motility in men. *Indian J Med Sci* (1993) 47:197-200.
122. Künzle R, Mueller MD, Huber AW, Drescher H, Bersinger NA. Seasonality in human semen quality of smokers and non-smokers: effect of temperature. *Asian J Androl* (2004) 6:243-247.
123. Santi D, Magnani E, Michelangeli M, Grassi R, Vecchi B, Pedroni G, Roli L, De Santis MC, Baraldi E, Setti M, Trenti T, Simoni M. Seasonal variation of semen parameters correlates with environmental temperature and air pollution: A big data analysis over 6 years. *Environ Pollut.* (2018) 235:806-813.
124. Malm G, Haugen TB, Henrichsen T, Bjørsvik C, Grotmol T, Saether T, Malm J, Figenschau Y, Hagmar L, Rylander L, Levine RJ, Giwercman A. Reproductive function during summer and winter in Norwegian men living north and south of the Arctic circle. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89:4397-402.
125. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Estofan GM, Hernández M, Beltramone F, Molina RI, Vazquez-Levin MH. Association between meteorological variables and semen quality: a retrospective study. *Int J Biometeorol.* (2021) 65:1399-1414.
126. Khavrus V, Shelevytsky I. Geometry and the physics of seasons. *Phys Educ* (2012) 47:680-692.
127. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* (2016) 59:10-26.
128. Furnival GM, Wilson RW (1974) *Regressions by Leaps and Bounds.* *Technometrics* 16:499-511.
129. Hand DJ (1981) Branch and bound in statistical data analysis. *The Statistician* 30:1-13.
130. Hossain MZ, Bambrick H, Wraith D, Tong S, Khan AF, Hore SK, Hu W. Sociodemographic, climatic variability and lower respiratory tract infections: a systematic literature review. *Int J Biometeorol* (2019) 63:209-219
131. Bohmanova J, Misztal I, Cole JB. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J Dairy Sci* (2007) 90:1947-1956.
132. Menegassi SRO, Pereira GR, Bremm C, Koetz C Jr, Lopes FG, Fiorentini EC, McManus C, Dias EA, da Rocha MK, Lopes RB, Barcellos JOJ. Effects of ambient air temperature, humidity, and wind speed on seminal traits in Braford and Nellore bulls at the Brazilian Pantanal. *Int J Biometeorol.* (2016) 60:1787-1794.
133. Llamas Luceño N, de Souza Ramos Angrimani D, de Cássia Bicudo L, Szymańska KJ, Van Poucke M, Demeyere K, Meyer E, Peelman L, Mullaart E, Broekhuijse MLWJ, Soom AV. Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development in vitro. *Theriogenology* (2020) 141:16-25.
134. Srinivasan AK, Freyle J, Gitlin JS, Palmer LS. Climatic conditions and the risk of testicular torsion in adolescent males. *J Urol* (2007) 178:2585-2588.
135. Golher DM, Kumaresan A, Saraf KK, Chhillar S, Nayak S, Tripathi UK, Bhaskar CN, Lathwal SS, Mohanty TK. Influence of season and climatic

- variables on testicular cytology, semen quality and melatonin concentrations in crossbred bucks reared under subtropical climate. *Int J Biometeorol* (2018) 62:1709-1719.
136. Smolensky MH, Reinberg A, Bickova-Rocher A, Sanford J. Chronoepidemiological search for circannual changes in the sexual activity of human males. *Chronobiologia* (1981) 8:217-230.
  137. Meriggiola MC, Noonan EA, Paulsen CA, Bremner WJ (1996) Annual patterns of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and inhibin in normal men. *Hum Reprod* 11:248-252.
  138. Pawlowski B, Sorokowski P. Men's attraction to women's bodies changes seasonally. *Perception*. (2008) 37:1079-85.
  139. Lauritsen JL, White N. Seasonal Patterns in Criminal Victimization Trends. U.S. Department of Justice Office of Justice Programs Bureau of Justice Statistics NCJ (2014) 245959:1-21.
  140. Demir A, Mehmet U, Arslan OE. The Effect of Seasonal Variation on Sexual Behaviors in Males and Its Correlation with Hormone Levels: A Prospective Clinical Trial. *Cent European J Urol* (2016) 69:285-289
  141. Frungieri MB, Calandra RS, Rossi SP. Local Actions of Melatonin in Somatic Cells of the Testis. *Int J Mol Sci* (2017) 18:E1170.
  142. Ruhayel Y, Malm G, Haugen TB, Henrichsen T, Bjørsvik C, Grotmol T, Saether T, Malm J, Figenschau Y, Rylander L, Levine RJ, Giwercman A. Seasonal variation in serum concentrations of reproductive hormones and urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in men living north and south of the Arctic Circle: a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. (2007) 67:85-92.
  143. Bellastella G, Pane E, Iorio S, De Bellis A, Sinisi AA. Seasonal variations of plasma gonadotropin, prolactin, and testosterone levels in primary and secondary hypogonadism: evidence for an independent testicular role. *J Endocrinol Invest* (2013) 36:339-342.
  144. Merviel P, Lourdel E, Cabry R, Brzakowski M, Dupond S, Boulard V, Demailly P, Brasseur F, Copin H, Devaux A. Pour la pratique des inséminations intra-utérines après l'âge de 35ans chez la femme [Intrauterine inseminations in women over 35: the pros]. *Gynecol Obstet Fertil*. (2010) 38:283-9.

# DISMINUCIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN EN LOS ÚLTIMOS 30 AÑOS

Lucía Rosa-Villagrán<sup>1</sup>

Natalibeth Barrera<sup>2,3</sup>

José Montes<sup>2</sup>

Rossana Sapiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Histología y Embriología. Facultad de Medicina. Universidad de la República, Uruguay. <sup>2</sup>Laboratorio de Andrología, Reprovita-Fertilab Laboratorio de Análisis Clínicos, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup> Laboratorio de FIV. Centro de Esterilidad Montevideo (CEM), Montevideo, Uruguay.

Autor correspondiente: Rossana Sapiro. Correo electrónico: rossanasapiro@fmed.edu.uy

## Cápsula

En los últimos años, ha habido una creciente preocupación por la posible existencia de una disminución global de la fertilidad de los hombres. Específicamente, existen evidencias que indican que la calidad del semen ha disminuido paulatinamente con el tiempo. Sin embargo, los datos que muestran cambios en la calidad de los espermatozoides suelen ser inconsistentes. Parte de las contradicciones entre los estudios se atribuyen a diferencias geográficas. Sorprendentemente, pocos estudios incluyen datos de países Latinoamericanos, lo que crea un sesgo en las conclusiones. Este estudio tiene como objetivo determinar cómo ha evolucionado la calidad del semen durante los últimos 30 años en Uruguay, comparando los datos con otros estudios similares. También se pretende revisar los factores más importantes que podrían explicar los cambios en la calidad del semen. Para ello, se analizaron historias clínicas de candidatos a donantes de semen presuntamente sanos, con edades comprendidas entre los 18 y los 36 años, que voluntariamente solicitaron ser considerados donantes de semen entre 1988 y 2019.

Las variables estudiadas fueron los parámetros del espermograma clásico establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los factores relacionados a la calidad espermática que figuraban en sus historias clínicas. Encontramos una disminución estadísticamente significativa en la concentración de espermatozoides, en el porcentaje de espermatozoides que presentaba motilidad progresiva rápida y en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal durante el período estudiado. No hubo disminución de la vitalidad, el volumen seminal ni la motilidad progresiva total. Las modificaciones en dichos parámetros no se asociaron con el consumo de drogas recreativas u otros factores ambientales. Concluimos que la calidad del semen de los candidatos a donantes en Uruguay disminuyó durante el período analizado, observando esa disminución en parámetros del espermograma que clásicamente se asocian con la fertilidad masculina. Si bien estos parámetros se mantuvieron por encima de los valores normales recomendados por la Organización Mundial de la Salud como indicadores de fertilidad, su disminución advierte sobre la necesidad de continuar la búsqueda de los posibles mecanismos que expliquen el suceso, así como la comprobación de si esto también se produce en la población general, contribuyendo al aumento de la infertilidad de la pareja.



## Introducción

El término infertilidad refiere a la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo clínico luego de un año de actividad sexual no protegida (1). Es un fenómeno multifactorial, mundialmente extendido, que puede alcanzar entre el 8% y el 15% de la población en etapa reproductiva por lo que en 2010 se calculó que el número total de parejas afectadas por esta condición es 48,5 millones. Dentro de sus causas, se estima que el factor masculino representa al menos 30–50% de estos casos (2). Esto se explica porque se considera que la población masculina es responsable de forma independiente del 20% al 30 % de los casos de infertilidad, pero que en la totalidad de los casos, el factor masculino contribuiría en hasta el 50% cuando se le agregan causas mixtas (femeninas y masculinas) (3).

Como consecuencia del aumento de la edad de las parejas en el momento de la concepción, los cambios en el estilo de vida y los factores ambientales, así como otros factores aún desconocidos, se predice que se produzca un aumento aún más pronunciado en el número de parejas infértiles en los próximos años creando, por tanto muy probablemente, un problema de salud no solo individual sino poblacional (4-7). En el caso del hombre, se calcula que la incidencia de la infertilidad masculina en países industrializados ha aumentado de un 7% a 8% en 1960 a un 20% a 35% en la actualidad, lo cual significa que en un período tan corto como 60 años, la incapacidad de concepción por causa masculina se ha triplicado (8). Mundialmente existe una importante controversia con respecto a si existe una disminución en la calidad espermática lo cual explicaría, al menos en parte, la disminución de los índices de fertilidad de la pareja (9).

La forma de comprobar si existe disminución en la fertilidad del hombre ha sido tradicionalmente a través del reconocimiento de un decremento de los parámetros del semen. El espermograma (estudio del semen, esperma o eyaculado), sigue siendo la piedra angular del diagnóstico andrológico (10), que si bien no es indicativo absoluto de fertilidad o infertilidad, brinda importante información sobre variables funcionales del semen y de las células espermáticas. El deterioro de la calidad del semen fue reportado por primera vez en 1974 por *Nelson y Bunge* (11) quienes observaron que los participantes de su estudio tenían una concentración de espermatozoides promedio significativamente mucho menor (48 millones/ml) que el promedio previamente establecido en 1951 (107 millones/ml) (12).

A partir de ese momento las publicaciones referentes al tema han sido inconsistentes y han disparado un debate internacional acerca de la posibilidad de una disminución en los índices de fertilidad masculina.

## Disminución en la calidad del semen en las últimas décadas

En 1992 *Carlsen et al* publicaron un meta-análisis indicando que la calidad del semen declinaba anualmente (13). Sin embargo, los análisis realizados posteriormente continuaron produciendo datos contradictorios. Algunos informes mostraron un deterioro de la calidad del semen (14-17) mientras que en otros estudios esto no se ha observado (18-19). La diferencia entre estos hallazgos puede ser consecuencia por ejemplo de cambios descritos en los métodos de laboratorio, problemas estadísticos, heterogeneidad de las poblaciones seleccionadas para los estudios (hombres fértiles o infértiles, regiones geográficas, grupos étnicos) (21). Además, características como la edad, el estilo de vida, factores como el tabaquismo, el consumo de alcohol o drogas, el estrés y la obesidad, entre otros, han sido asociados en menor o mayor grado con los parámetros seminales (21-25).

Nuestro trabajo se focaliza en el estudio del semen de hombres jóvenes y los factores ambientales y sociales que pueden estar afectando los parámetros seminales con el tiempo.

## Factores que alteran la calidad espermática

Como se dijo, la tendencia a la disminución de la calidad espermática ha sido relacionada con variaciones en estilo de vida y comportamiento de la población masculina en los últimos años, a saber, el aumento en la edad de la concepción, aumento del estrés psicológico, obesidad,

consumo de drogas y variaciones en el comportamiento sexual o factores ambientales como una mayor exposición a tóxicos (26-29).

## **Edad**

La edad de concepción de los hombres, al igual que en las mujeres ha ido aumentando en las últimas décadas. Durante el periodo de 2003 a 2013 se observó que los nacimientos de hijos de hombres de 35 a 39, 40 a 44, 45 a 49 y 50–54 han aumentado en 9%, 14%, 16%, y 8%, respectivamente (el grupo de hombres de 30 a 34 años disminuyó 2% en ese periodo). Este patrón se está repitiendo internacionalmente (30) y no parece haberse modificado en los últimos años<sup>2</sup>.

Se han documentado alteraciones en cuanto al volumen seminal, recuento de células espermáticas y motilidad espermática cuanto mayor sea la edad del varón, siendo esto más claro luego de los 40 años donde se determinó la existencia de un punto importante de inflexión (31). En un meta-análisis publicado en el año 2014, se determinó la misma asociación negativa entre parámetros seminales y la edad. En el mismo estudio, también se observó que la fragmentación del ADN estaría relacionada a la creciente edad paterna, lo cual podría tener un papel predictor y un rol preponderante en los malos resultados obtenidos en las técnicas de fertilización, en la tasa de embarazo, así como también en las complicaciones en el mismo (32). Tomando estos datos en conjunto, la edad avanzada en la paternidad podría explicar la caída en los niveles de fertilidad de la pareja. Sin embargo, no alcanzaría para comprender la disminución observada en los parámetros seminales ya que en la mayoría de los estudios esto es corregido por edad.

## **Contaminación ambiental**

### Contaminación ambiental

La contaminación ambiental de los países más industrializados ha demostrado ser un importante determinante en los índices de calidad espermática. De hecho, es destacable que las alteraciones del sistema reproductor masculino resultan ser buenos marcadores de la contaminación ambiental (8). Los contaminantes que polucionan el ambiente generan alteraciones directas en la espermatogénesis, sobre todo por un aumento de la afectación del ADN nuclear y su correspondiente grado de fragmentación y también indirectamente a través de alteraciones hormonales. Se han publicado varios artículos de revisión en el tema, (por ej. *Mann et al.* 2020) enumerando toxinas ambientales como bisfenol A (BPA), ftalatos, cadmio y triclosán como agentes potenciales de daño (29). El plomo también ha sido implicado en la afectación de la espermatogénesis y los parámetros espermáticos (8). Se ha comprobado que aún exposiciones cortas (de 2 o 3 meses) a ambientes ampliamente contaminados disminuyen de forma significativa los niveles de motilidad espermática. Se destaca, sin embargo, que la exposición a contaminantes tendería a ser un factor reversible: al removerse la exposición a contaminantes la motilidad espermática reanudaría sus valores normales (8).

### Radiaciones

La exposición a radiaciones electromagnéticas emitidas por artículos electrónicos es perjudicial para la reproducción masculina. Estas radiaciones afectan principalmente a las células madres testiculares dado su alto índice mitótico así como también a aquellas células que sufren meiosis durante la espermatogénesis. Debido al incremento de la utilización y fácil adquisición de equipos electrónicos que emiten radiaciones con estas características, la exposición a radiaciones electromagnéticas se ha convertido en una importante variable a considerar (33-36).

## **Hábitos alimenticios y abuso de sustancias recreativas**

### Sobrepeso y obesidad

La obesidad es una alteración metabólica definida como un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> o perímetro abdominal aumentado (en hombres mayor o igual a 102 cm y en mujeres mayor o igual a 88 cm). Su incrementada incidencia es una preocupación mundial; la prevalencia mundial de obesidad casi se triplicó entre 1975 y 2016<sup>3</sup> (29). Este trastorno metabólico puede afectar a los espermatozoides a través de una variedad de fenómenos, entre los cuales se destaca el aumento del estado inflamatorio y del estrés oxidativo. Se ha determinado la existencia de una relación entre el sobrepeso y obesidad y el impacto negativo sobre los parámetros seminales (37), fundamentalmente en su concentración, provocando oligozoospermia. Los estados de hiperinsulinemia e hiperglucemia también presentan un efecto inhibitorio directo en la cantidad y calidad seminal, situación que parece asociarse a la disfunción mitocondrial espermática secundaria a dicho estado lípido-glucémico (38).

### Dieta

Aunque la dieta y la obesidad están indudablemente relacionadas, existe una evidencia creciente de que la dieta puede contribuir de forma independiente a la disminución de los parámetros espermáticos. Según el Departamento de Agricultura, (USA) el promedio de calorías consumidas por persona de "grasas y aceites agregados" ha aumentado de 337 en 1970 a 562 en 2010. Esto se asoció con un aumento de la disponibilidad per cápita de grasas y aceites de 52,5 libras por persona en 1970 a 82,2 libras en 2010 (39). Una dieta basada en alimentos de origen vegetal, pescado y pollo se relaciona con un aumento del recuento total de espermatozoides y de la motilidad espermática. Como contraparte, una dieta basada en carne roja procesada o en alimentos ricos en grasas se asocia a una mala calidad seminal (38). Estudios llevados a cabo en ratones expuestos a dietas ricas en grasas han demostrado la generación de radicales libres del oxígeno (ROS) en cantidades significativamente mayores que los controles (38).

### Alcohol

Otros hábitos como por ejemplo el consumo de alcohol en cantidades regulares, genera una disminución del recuento total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides con morfología normal e incrementa la fragmentación del ADN (38). La exposición directa de las células espermáticas a las concentraciones de alcohol encontradas en el plasma sanguíneo luego de un consumo moderado- intenso ha mostrado ser dañino para las mismas, afectando principalmente su motilidad y morfología de una manera dosis-dependiente (34). De acuerdo a la OMS, en África, América y las regiones Mediterráneas del Este, el consumo de alcohol per cápita se ha mantenido bastante estable, en Europa ha disminuido y en Asia (específicamente regiones Este y Sur) aumentado (40). Es decir que las diferencias regionales encontradas en los diversos estudios pueden estar reflejando también los hábitos alimenticios o de consumo de drogas recreativas de las diferentes poblaciones.

### Consumo de sustancias recreativas

El consumo de drogas de uso recreativo, en su mayor parte ilegales, han mostrado una asociación negativa con los índices de fertilidad masculina. El consumo regular de marihuana estuvo asociado a una disminución del recuento y concentración espermática y este efecto negativo se exacerba al establecer el uso combinado con otras drogas. El efecto se explicaría por la desregulación del sistema de endocannabinoides endógenos, que resultaría finalmente en el agravio del proceso de espermatogénesis normal (34). Con la reciente legalización de la marihuana en muchos países han surgido nuevos estudios que investigan los efectos de la marihuana en los parámetros de los espermatozoides. Carroll y colaboradores (41) encontraron que los hombres con una historia reciente de uso de marihuana tenían mayor probabilidad de presentar espermatozoides anormales en el espermograma. Además, Payne y colaboradores (42)

realizaron una revisión sistemática de 48 estudios concluyendo que, aunque el campo está poco investigado, la evidencia hasta ahora sugiere que el consumo de marihuana puede estar relacionado negativamente con la morfología de los espermatozoides.

### **Estrés psicológico**

La inhibición del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal mediada por estrés psicológico estaría relacionada con la obtención de bajos índices reproductivos en el hombre. En sus múltiples formas, el estrés activa los mecanismos de respuesta mediados por el sistema nervioso simpático en conjunto con el sistema hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, los cuales afectarían la respuesta del eje gonadal, resultando en el decremento funcional de las células de Leydig y de las células espermatogénicas (34).

### **Tabaco**

Entre los fumadores, el pico máximo de consumo se observa en el entorno de los 20-45 años de edad, siendo el 40% de la población tabaquista individuos de sexo masculino en edad reproductiva. Dada la alta prevalencia de este tipo de consumo, se estudió el efecto del tabaco sobre la fertilidad y se observó que los componentes del tabaco y cigarrillos determinan la presencia de alteraciones en los parámetros hormonales normales de la espermatogénesis. Dentro de los más de 90 componentes químicos del cigarrillo, existen al menos 14 sustancias que presentan un efecto dañino directo sobre la fertilidad (43-45). Dentro de los parámetros espermáticos más afectados por los efectos tóxicos de los componentes del tabaco se destaca la disminución de la vitalidad espermática, la disminución del recuento y motilidad espermática, así como un aumento de la alteración morfológica de los mismos (teratozoospermia). Existe una relación directa entre los años de consumo de tabaco y la cantidad de espermatozoides en el semen, observando que en los consumidores de tabaco por más de 5 años presentan oligozoospermia hasta en un 40% de los casos. Los tóxicos tabáquicos también generan cambios a nivel nuclear aumentando el estrés oxidativo y la fragmentación del ADN espermático (43). Si bien el consumo de tabaco disminuyó en los últimos años por la implementación de políticas públicas antitabaco, más de un tercio de los hombres adultos en todo el mundo continúan con el hábito de fumar, lo que quizás lo mantiene como uno de los contribuyentes más generalizados de la disminución en la fertilidad masculina (46-48).

### **Factores regionales y calidad espermática**

Muchas de las variaciones importantes en el recuento de espermatozoides y calidad del semen se pueden probablemente atribuir a factores locales y regionales. Diferencias demográficas en la industrialización, opciones de estilo de vida (vinculadas a áreas urbanas o rurales) y también predisposición étnica y genética se consideran los factores más probables de las variaciones en los resultados cuando se analiza la calidad espermática. Por ejemplo en una reevaluación del artículo de Carlsen y colegas (13) realizada por Bahadur y colaboradores (49) reveló que el país de origen y el tiempo son los principales factores que definen las variaciones en la calidad espermática (9).

La mayoría de los estudios tanto en EEUU, Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda y Asia coinciden en que existe un descenso en varios de los parámetros seminales (9,50). Sorprendentemente existen pocos datos provenientes de Latinoamérica y África (51, 52). Unos pocos estudios llevados a cabo en Brasil (53,54) y Argentina (55) mostraron descenso de los parámetros seminales. En Venezuela, un estudio realizado en parejas infértiles, mostró que la proporción de hombres que presentaban azoospermia u oligospermia no se modificó entre 1981 y 1995 (56).

Tomando en cuenta lo antedicho y que falta información con respecto a la salud del hombre relacionada a sus condiciones geográficas y ambientales, especialmente fuera de los países más

industrializados, este trabajo tiene como objetivo analizar si los valores de los parámetros espermáticos han disminuido durante los últimos años en Uruguay.

En Uruguay, se realizó un estudio previo en 71 donantes de semen aceptados en el programa de donación, que mostró que la concentración de espermatozoides había disminuido en paralelo con un aumento del volumen de semen. Se observó que la concentración de espermatozoides había sido compensada por un aumento en el volumen de semen, manteniendo el número total promedio de espermatozoides sin cambios (57). Sin embargo, este estudio analizó solo los donantes que efectivamente habían sido incluidos en el programa de donantes de semen para procedimientos de reproducción médicamente asistida, lo que significa que solo se incluyeron en el estudio hombres con mejor calidad de semen y que habían superado estrictos exámenes médicos. El hecho de que solo se analice una pequeña población del grupo de candidatos a donantes puede crear un sesgo en la conclusión de que la calidad del semen se mantuvo sin cambios en los últimos años.

Para analizar si realmente podría existir cambios en la calidad espermática con los años en el Uruguay, incluimos a todos los hombres sanos que solicitaron ser donantes de semen, independientemente de si fueron o no aceptados en el programa de donación, del mismo centro durante los últimos 30 años. Analizamos no solo sus espermogramas, sino que también factores como la edad, el índice de masa corporal, el consumo de tabaco, alcohol y drogas.

## **Materiales y Métodos**

### **Población de estudio**

Analizamos 400 registros médicos de candidatos a donantes de semen presuntamente sanos, con edades comprendidas entre los 18 y los 36 años, que voluntariamente solicitaron ser considerados donantes de semen en una clínica de fertilidad (Fertilab, ahora Reprovitas) entre 1988 y 2019. De estos individuos, 317 tenían registros de los valores de sus parámetros espermáticos.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Se incluyó a los candidatos a donantes de semen que respondieron a carteles publicitarios y anuncios en la plataforma web, solicitando que fueran presuntamente sanos y estuvieran dispuestos a pasar una serie de pruebas que incluían la valoración de antecedentes médicos, examen físico y pruebas de laboratorio. Para calificar como donantes, los hombres cumplieron con tres rondas de evaluación, comenzando con una entrevista inicial y un examen físico realizado por un médico. Durante la entrevista, se analizaron los antecedentes familiares, sus hábitos, estilo de vida y la motivación del candidato para la donación de semen, buscando que ésta fuese altruista. A esto le siguió un análisis de semen completo por medio del espermograma. Finalmente, se realizaron análisis de sangre y orina de rutina que incluyeron pruebas para descartar enfermedades metabólicas e infecciosas. Desde 2005 se ha incluido un cribado genético de fibrosis quística.

Se solicitó a todos los candidatos que firmaran un consentimiento informado en el que se explicaba y solicitaba autorización para que sus datos pudiesen utilizarse de forma anónima con fines de investigación. Las personas que se negaron a dar su consentimiento informado fueron excluidas de este estudio.

### **Análisis de Semen**

Las muestras de semen se obtuvieron mediante masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia sexual. Las muestras se mantuvieron sin procesar durante aproximadamente 1 hora para permitir que se produjera la licuefacción. Los parámetros evaluados en este estudio fueron el volumen de semen, la concentración, el número total, la motilidad, la morfología y la vitalidad de los espermatozoides. Las muestras de semen se analizaron mediante protocolos de acuerdo con las direcciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), con base en los procedimientos descritos en el último manual de laboratorio disponible en el momento de los exámenes de las

muestras (1, 58, 59). Para el análisis estadístico se utilizaron los parámetros del semen de una única muestra por persona (la primera presentada por el donante).

Recuento de espermatozoides. Después de la licuefacción, cada muestra se transfirió a un tubo cónico graduado con una pipeta Pasteur estéril para la verificación del volumen. Se examinó una alícuota mediante microscopía óptica utilizando una cámara apropiada (cámara de Makler). Los resultados se indicaron luego de corrección estándar de cada dilución para obtener la concentración final de millones de espermatozoides por mL (millones /mL) (1, 58, 59).

### Motilidad espermática

Se colocó una alícuota de 10  $\mu$ L de la muestra de semen entre dos cubreobjetos para una doble evaluación al microscopio óptico, siguiendo los criterios recomendados por los manuales de la OMS. Se contaron al menos 100 espermatozoides en cada portaobjetos, clasificándolos como grado a (motilidad progresiva rápida o velocidad  $\geq 25$   $\mu$ m por segundo); grado b (motilidad progresiva lenta o velocidad  $< 25$   $\mu$ m por segundo); grado c (motilidad no progresiva o velocidad  $< 5$   $\mu$ m por segundo); o grado d (espermatozoides inmóviles), mostrando los resultados porcentuales en cada categoría. La motilidad también se clasificó como progresiva (suma del porcentaje de espermatozoides clasificados como grados a y b) y motilidad total (suma del porcentaje de espermatozoides clasificados como grados a, b y c).

### Morfología espermática

Se utilizó tinción de Papanicolaou modificada para evaluar la morfología de los espermatozoides. Para cada muestra, se prepararon dos frotis y se evaluaron 200 espermatozoides. Las anomalías de la cabeza, el cuello y la cola de los espermatozoides se evaluaron con un gran aumento ( $\times 1000$ ) utilizando un objetivo de inmersión en aceite de alta resolución (100  $\times$ ) y una óptica de microscopio de campo brillante. Los resultados de la tinción de la morfología de los espermatozoides se expresaron como "porcentaje de morfología normal del semen". Las evaluaciones de la morfología de los espermatozoides se realizaron utilizando diferentes criterios durante el tiempo del estudio. Desde 1988 y hasta diciembre de 1999 se analizó la morfología de los espermatozoides según los manuales de la OMS disponibles en el momento de los exámenes (58, 59). A partir del año 2000, Fertilab aplicó la categorización de criterios estrictos de Kruger para evaluar la morfología de los espermatozoides (60).

Vitalidad espermática. La vitalidad de los espermatozoides se evaluó determinando la integridad de la membrana de estas células utilizando un método de exclusión tintorial. Este método se basa en el principio de que las membranas plasmáticas dañadas, así como las que pertenecen a las células muertas, permiten la entrada de tinciones que normalmente son impermeables en la célula viva.

### **Obtención de datos**

Para el análisis de las variables mencionadas en este estudio, se obtuvieron los datos necesarios de las historias clínicas de la base de datos del laboratorio Fertilab. Estos registros médicos se disociaron irreversiblemente de los datos de identificación, lo que garantiza el anonimato del sujeto y la confidencialidad de los datos. La disociación de datos fue realizada por personal ajeno a la investigación. Se utilizaron hojas de registro de edad, peso, altura, consumo de tabaco, alcohol y drogas, volumen de semen, número total de espermatozoides, concentración, motilidad, morfología y vitalidad de los espermatozoides.

### **Consideraciones éticas**

Además de las consideraciones éticas ya mencionadas (confidencialidad, firma el consentimiento informado) se siguieron las observaciones éticas como se describe en la declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional Fertilab-CEM ([comiteeticaferticem@outlook.com](mailto:comiteeticaferticem@outlook.com)) y el Comité de Ética de la Facultad de Medicina-Montevideo-Uruguay.

## Análisis estadístico

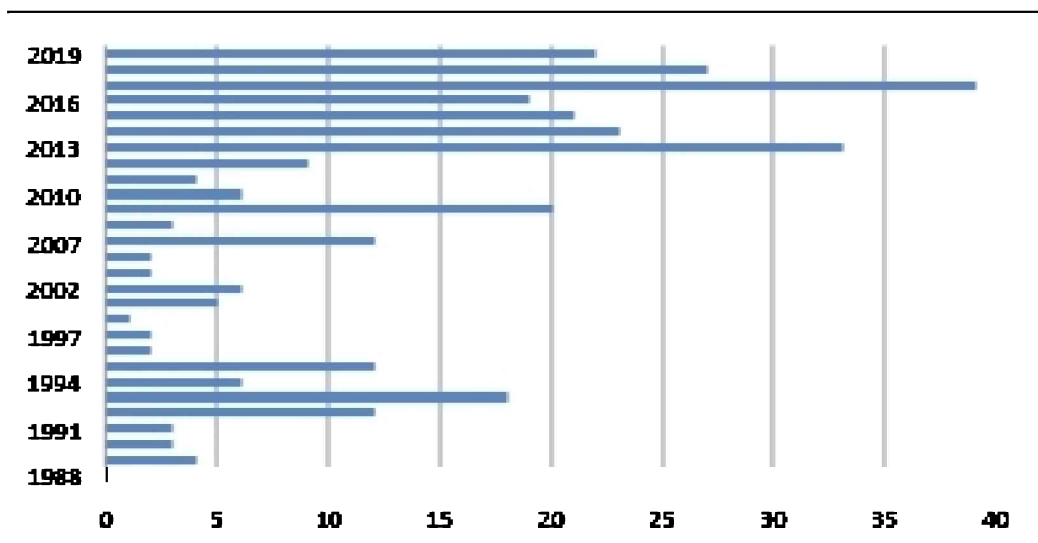
El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)”, y el software estadístico JASP Team (2020), JASP (Versión 0.140). Los datos se expresaron como valores de mediana y rangos intercuartílicos, mientras que también se informaron las medias y las desviaciones estándar (DE). La distribución normal de datos se probó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. La mayoría de los valores de los parámetros de los espermatozoides no se distribuyeron normalmente. La correlación de los valores de los parámetros seminales y el año de recolección de la muestra se determinaron mediante la prueba de correlación de Spearman. Se aplicó regresión lineal para calcular las modificaciones de la concentración de espermatozoides y el número total de espermatozoides por año.

Se utilizaron las pruebas *t* de Student o la prueba de Mann-Whitney (según la distribución de los datos) para comparar los datos entre dos grupos. La comparación entre múltiples grupos se realizó utilizando la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba posterior de Tukey o la prueba de Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado para analizar variables categóricas. La relación de la concentración de espermatozoides y su motilidad con las variables independientes (edad en el momento de la donación, consumo de cigarrillos y abuso de alcohol) se testeó mediante análisis de regresión múltiple. La mejor transformación de los datos que arrojaron distribuciones normales para las variables sin distribuciones normales fue la transformación logarítmica (base 10), excepto para la morfología de los espermatozoides donde se aplicó la transformación de Johnson. Evaluamos el ajuste de los modelos de regresión probando la normalidad de los residuos e inspeccionando las gráficas de residuos. Los datos de edad, IMC y el número de hombres que consumen drogas no se incluyeron en el análisis de regresión múltiple. El IMC se correlacionó positivamente con la edad de los hombres, no mostrando variaciones en el período, mientras que el consumo de drogas se registró sólo desde 2012. Los resultados se consideraron significativos con un valor de *p* de dos colas <0,05.

## Resultados

### Descripción de la población

Un total de 400 hombres asistieron a la Clínica de Andrología durante el periodo de 1988 a 2019 solicitando ser candidato a donante de semen. La cantidad de solicitudes y, por lo tanto, de espermogramas realizados fue muy variable durante los años del estudio (**Figura 1**).



**Figura 1.** Distribución del número de espermogramas obtenidos por año en el periodo de estudio comprendido entre 1988 y 2019.

En este estudio se analizaron un total de 317 de muestras de semen de hombres que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos en el protocolo. La edad de los donantes incluidos estuvo comprendida entre 24 y 36 años (media  $\pm$  DE=24.5  $\pm$  4.3), la estatura entre 160 y 196 cm

(media  $\pm$  DE=177.0  $\pm$ 7), el peso corporal entre 55 y 105 kg (media  $\pm$  DE=74.6  $\pm$ 8.9). Se calculó también el índice de masa corporal que se distribuyó entre 18.4 y 34.55 (media  $\pm$  DE=23.7 $\pm$ 2.6)

El 20% de los hombres (42/211) declaró que fumaba regularmente, el 43% de los hombres (91/211) indicó que consumía alcohol con regularidad y el 24% (24/114) refirió el consumo regular de otras drogas (particularmente marihuana). Los datos faltantes en el caso del consumo de alcohol y tabaco fueron del 33% (116/317) y del 66% (210/317) en el caso de la marihuana.

### Parámetros del espermograma

Excluyendo a los hombres que fueron rechazados por no cumplir con los criterios de inclusión establecidos o porque se negaron a firmar el consentimiento informado para ser parte del estudio, se analizaron los datos de 317 candidatos. La **Tabla 1** resume las estadísticas descriptivas de la evaluación inicial del semen, incluido el volumen, la concentración de espermatozoides, la vitalidad, el porcentaje de motilidad y morfología normal de los espermatozoides de cada muestra. La media de todos los valores de los parámetros del semen estuvo por encima de los valores de corte recomendados por la OMS desde el año 2010 (1).

**Tabla 1.** Descripción de los parámetros seminales de los donantes.

	Volumen	Concentración	Vitalidad	Morfología	Motilidad a	Motilidad progresiva (a+b)
N	317	317	209	313	317	316
Media $\pm$ DE	3.5 $\pm$ 1.6	64.6 $\pm$ 40.9	85.4 $\pm$ 12.4	13.8 $\pm$ 11.6	28.9 $\pm$ 14.4	60.2 $\pm$ 13.6
Máximo	0.3	300	98	80	59	87
Mínimo	8.0	7	55	3	2	21
Mediana	3.2	58	90	11	27	62
25 <sup>th</sup> centile	2.3	33.9	77.5	8	19	52
75 <sup>th</sup> centile	4.5	85.5	95	15.5	38	69

### Descripción de los parámetros seminales de los donantes

Los datos se obtuvieron mediante el análisis del primer espermograma de 317 individuos recogidos entre 1988 y 2019. N = número de donantes. DE = Desviación estándar (el volumen se expresa en mL, la concentración en millones/mL mientras que el resto de los parámetros en %).

### Variaciones del semen a lo largo del tiempo

El análisis de los valores de los parámetros de los espermatozoides mostró que hubo cambios significativos a lo largo del tiempo en la concentración de espermatozoides, la motilidad de los espermatozoides rápida (grado a), la motilidad de los espermatozoides lenta (grado b) y la morfología de los espermatozoides normal, mientras que las otras características del semen no se modificaron (**Figura 2, Tabla 2**).

La concentración de espermatozoides se expresó como millones de espermatozoides por mililitro y la evaluación de sus cambios a lo largo del tiempo se determinó mediante un análisis de correlación de Spearman. El volumen de semen no mostró variaciones durante los 30 años, así como tampoco lo hizo la vitalidad de los espermatozoides (**Tabla 2**).

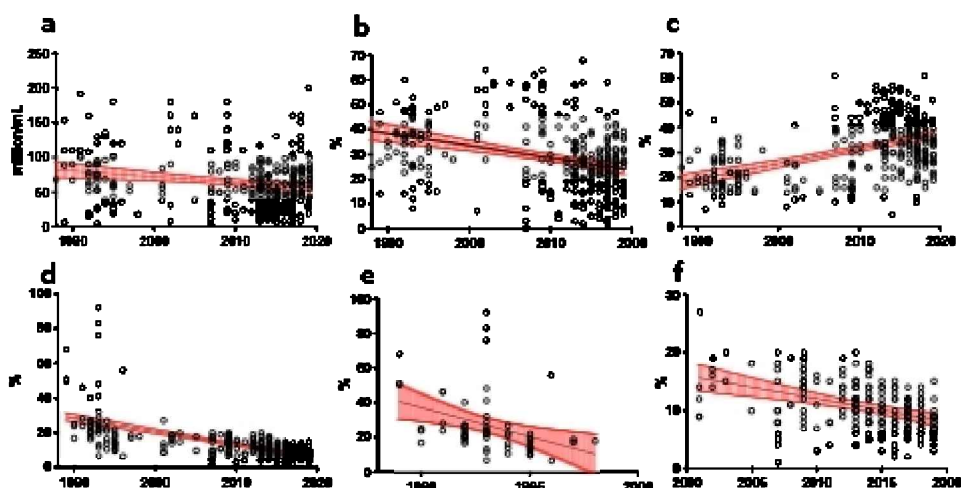


**Tabla 2.** Análisis de correlación de los parámetros espermáticos en el tiempo.

Variable	Spearman's rho	Valor p
Volumen (ml)	0,067	0,234
Recuento (mill/ml)	- 0,15	0,008
Vitalidad	0,057	0,409
Motilidad a	-0,34	<0,001
Motilidad b	0,397	<0,001
Motilidad a+b	0,018	0,746
Motilidad a+b+c	-0,06	0,336
Morfología normal	-0,69	< 0,001
Morfología 1988-2000	-0,53	< 0,001
Morfología 2001-2020	-0,42	<0,001

**Análisis de correlación de los parámetros espermáticos en el tiempo.** Resultados de correlación entre los parámetros del espermograma y tiempo expresados por el coeficiente de correlación de Spearman y su correspondiente valor de p (p-value).

La concentración de espermatozoides disminuyó significativamente durante los 30 años abarcados a razón de 0,9 millones/mL por año  $R^2 = 0,03$  (Fig. 2-a y Tabla 2).

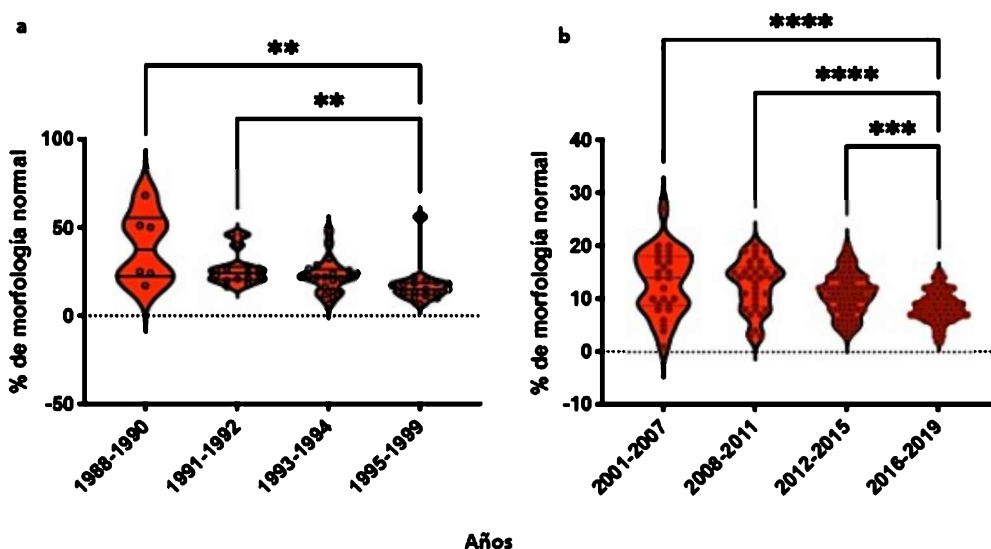


**Figura 2.** Representación gráfica de la asociación entre los parámetros del semen que se modificaron significativamente y el año del estudio. A) Concentración de espermatozoides expresada en millones de células por mililitro; n=317 b) porcentaje

de espermatozoides con motilidad progresiva rápida y c) motilidad progresiva lenta, n= 317 d) porcentaje de espermatozoides con morfología normal durante todo el período n=317 e) porcentaje de espermatozoides con morfología normal medidos hasta el año 2000 n=65 f) porcentaje de espermatozoides con morfología normal luego del año 2000 (criterio estricto de Kruger) n=252.

El porcentaje de espermatozoides que se mueven con una motilidad progresiva rápida (motilidad a) disminuyó de forma estadísticamente significativa con el tiempo (**Tabla 2** y **Figura 2-b**). Sin embargo, el patrón de motilidad progresiva lenta (motilidad b) aumentó significativamente (coeficiente r 0.39 p < 0.001, **Tabla 2** y **Figura 2-c**). No hubo diferencias estadísticas ni en la motilidad progresiva (motilidad a + b) ni en la motilidad total (motilidad a + b + c) durante el período estudiado (**Tabla 2**).

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal disminuyó durante el período estudiado (**Figura 2d** y **Tabla 2**). La morfología espermática puede reflejar la metodología aplicada en el momento del análisis. En consecuencia, el análisis de los datos se realizó dividiendo la muestra en dos grupos según la fecha de reclutamiento de los aspirantes a donantes (antes o después de 2000). En ambos grupos, el análisis de correlación demostró una disminución en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal a lo largo del tiempo. En el caso de los datos recolectados antes del año 2000, el análisis de correlación de Spearman mostró un coeficiente r de -0.5388, valor p < 0.0001 n = 63 (**Figura 2e** y **Tabla 2**). Después del año 2000, fecha coincidente con el comienzo de la aplicación de los criterios estrictos de Kruger para valoración de morfología, los datos mostraron un coeficiente r de Spearman de -0,4185 P < 0,0001; n= 250 (**Figura 2f** y **Tabla 2**). Los datos se dividieron arbitrariamente en 4 grupos en ambos períodos para incluir un número similar de donantes en cada grupo. La morfología normal de los espermatozoides disminuyó de  $39,2 \pm 20,2$  (media  $\pm$  DE) en el período 1988-1990 a  $17,4 \pm 10,2$  en 1995-1999 (prueba de Mann-Whitney, p < 0,03). La morfología normal de los espermatozoides disminuyó de  $13,1 \pm 6,0$  (media  $\pm$  DE) en 2001-2007 a  $8,5 \pm 2,8$  en 2016-19 (prueba t de Student, p < 0,05) (**Figura 3**).

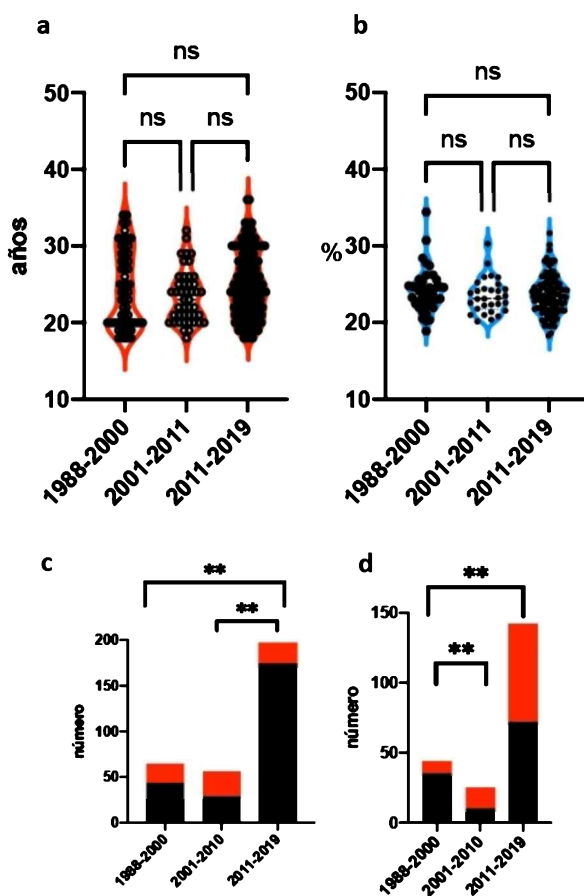


**Figura 3.** Representación gráfica de la relación entre la morfología normal de los espermatozoides del donante y el tiempo (según la metodología de análisis aplicada). Se dividió cada población en 4 grupos y se representa el número de espermatozoides considerados normales a) Representación gráfica de los espermatozoides morfológicamente normales entre el período 1988-1999, n = 65 b) Modificaciones de la morfología de los espermatozoides normales entre 2000 y 2019, n = 252. Prueba ANOVA de una vía, post prueba de Tukey \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Por otra parte, encontramos que el volumen de semen no cambió estadísticamente con el tiempo (**Tabla 2**). El número total de espermatozoides de las muestras de semen analizadas no se modificó durante el período del estudio (Spearman r -0.08764, p = 0.1194 y análisis de regresión lineal: R2 = 0.022).

## Características epidemiológicas de los hombres y su relación con los valores de los parámetros seminales con el tiempo

Para evaluar si las variaciones de los valores de los parámetros del semen con el tiempo dependían de las características epidemiológicas de los sujetos, se estratificó la población de estudio en tres grupos, cada grupo representando el número total de hombres reclutados en aproximadamente diez años (**Figura 4**).



**Figura 4.** Evolución de las características epidemiológicas de hombres fértiles candidatos para donación de semen durante el tiempo del estudio tomados en períodos de 10 años. a) Edad de los individuos b) Índice de masa corporal c) Número de donantes fumadores (rojo) y no fumadores (negro) d) Número de donantes que consumen alcohol (rojo) y que no lo hacen (negro). Todos los datos fueron obtenidos en períodos de 10 años consecutivos. \*\*  $p < 0,01$  Prueba de Chi cuadrado.

No hubo diferencias en la edad de los donantes durante el período de estudio (**Figura 4a**) ni en el índice de masa corporal (**Figura 4b**) por lo cual estas variables no se incluyeron en los análisis estadísticos de correlación múltiple). Observamos diferencias en el consumo de tabaco con una disminución en el número de fumadores (**Figura 4c**). El hábito de consumo de tabaco no se vio asociado a la disminución de los principales parámetros seminales: la media de la concentración de espermatozoides de los no fumadores en comparación con los fumadores fue de  $64,6 \pm 41,6$  versus  $73,3 \pm 35,4$   $p = 0,07$ , la motilidad progresiva  $60,5 \pm 12,8$  versus  $60,2 \pm 12,0$ ,  $p = 0,9$ , prueba de Mann-Whitney, mientras que la media de morfología fue de  $13,7 \pm 13,7$  en no fumadores versus  $15,7 \pm 8,7$   $p = 0,35$  en los no fumadores (analizada con la prueba de  $t$  de Student).

Hubo un aumento en la incidencia de consumo de alcohol en los hombres analizados. (**Figura 4d**). Sin embargo, no hubo disminución de la media  $\pm$  DE de los valores de los parámetros de los espermatozoides en los hombres que tenían un consumo basal de alcohol frente a los que no consumían alcohol (concentración de espermatozoides:  $67,9 \pm 43$  frente a  $64,7 \pm 36$  millones / ml, prueba de Mann-Whitney  $p = 0,6$ ; el porcentaje de motilidad espermática progresiva  $59,9 \pm 12,2$  vs  $61,6 \pm 13,4\%$ , prueba  $t$  de Student  $p = 0,3$ , y el porcentaje de morfología espermática normal  $15,9 \pm 14,0$  vs  $11,8 \pm 5,7$ , prueba de Mann-Whitney  $p = 0,09$ ).

El análisis de regresión múltiple no reveló una relación estadísticamente significativa entre los valores de los parámetros de los espermatozoides y las variables independientes probadas. El volumen de semen no se pudo predecir por la edad de los hombres, ni por el consumo de cigarrillos o alcohol ( $F(3,204)=1,998$   $p=0,12$   $R^2=0,03$ ). La concentración de espermatozoides tampoco tuvo asociación estadística con la edad, el tabaquismo o el consumo de alcohol ( $F(3,204) = 1,849$   $p = 0,14$   $R^2 = 0,026$ ). Ni la motilidad progresiva de los espermatozoides ( $F(3,204) = 0,44$   $p = 0,735$   $R^2 = 0,006$ ) ni la morfología espermática normal ( $F(3,106) = 0,552$   $p = 0,6$   $R^2 = 0,016$ ) pudieron predecirse mediante las mismas variables analizadas.

El consumo de drogas recreativas se comenzó a registrar a partir de 2012, por lo que los datos con respecto a esta variable sólo estaban disponibles para el último grupo (2011-2019) siendo de un 24% de los donantes de ese período y la variable no se incluyó en los análisis lineales múltiples. El consumo de drogas no se asoció estadísticamente con modificaciones en ninguno de los valores de los parámetros espermáticos analizados. La media  $\pm$  DE de los valores de los parámetros de los espermatozoides en los hombres que consumieron drogas frente a los que no fueron se muestran de la siguiente manera: concentración de espermatozoides:  $61,5 \pm 42,5$  vs  $58,8 \pm 26,4$  millones / ml (prueba de Mann-Whitney  $p = 0,8$ ); el porcentaje de motilidad espermática progresiva:  $60,9 \pm 13,5$  frente a  $58,7 \pm 26,4\%$ , (prueba t de Student,  $p = 0,8$ ), y el porcentaje de morfología espermática normal:  $9,8 \pm 8,0$  frente a  $9,9 \pm 3,7$  (prueba de Mann-Whitney  $p = 0,4$ ), respectivamente.

## Discusión

Los datos que indican que la calidad espermática ha disminuido en los últimos 50 años se han ido acumulando mundialmente y parecen acompañar un fenómeno de decaimiento en la fertilidad general de la población, especialmente en los países desarrollados (9). Sin embargo, los datos de otras regiones, especialmente provenientes de países de América del Sur son mucho más escasos.

Para intentar disminuir esta brecha en el conocimiento, en este trabajo hemos analizado los cambios en la calidad del semen en los últimos 30 años en Uruguay. Elegimos una población de aspirantes a donantes de semen que respondieron voluntariamente a las solicitudes que periódicamente se emiten desde el laboratorio de andrología y banco de gametos (Fertilab). El propósito de Fertilab es reclutar hombres que deseen participar en los programas de donación de semen, lo que significa que la población de estudio está compuesta por hombres jóvenes (menores de 36 años). Además, no incluimos a los hombres portadores de patologías que puedan comprometer su fertilidad (por ejemplo, diabetes, obesidad extrema, cáncer o presión arterial alta), lo que significa que los datos recopilados pueden considerarse provenientes de un grupo de hombres jóvenes sanos. Descubrimos que hubo una disminución en los valores de los parámetros del semen de estos hombres potencialmente fértiles a lo largo de los años. Específicamente, la concentración de espermatozoides, la morfología y el tipo de motilidad "a" disminuyeron durante el período analizado. No se encontró evidencia estadísticamente significativa que apoye la hipótesis de deterioro de otros parámetros, por ejemplo: motilidad progresiva total, vitalidad de los espermatozoides o volumen de semen.

Trabajos previos han demostrado que la disminución de la concentración de espermatozoides puede reflejar un aumento en el volumen de semen, por lo que contrarresta cualquier modificación significativa de estos parámetros (57). En comparación con el estudio mencionado, al analizar 317 donantes en lugar de 71 hombres, no detectamos un aumento en el volumen de semen, por lo que nuestros datos respaldan una disminución real en el número de espermatozoides con el tiempo.

La concentración de espermatozoides y el volumen del eyaculado han sido los dos parámetros más estudiados con el tiempo. La concentración de espermatozoides disminuyó durante este período, y nuestros resultados son concordantes con estudios similares que incluyen candidatos para la donación de espermatozoides (20, 61). La medida de la concentración de espermatozoides y el volumen del eyaculado son consideradas de las medidas más objetivas y precisas, al menos si son comparadas con la motilidad y la morfología espermática (20). Estos parámetros pueden ser considerados los menos dependientes de las diferencias y sesgos explicados por variaciones de los procedimientos de laboratorio o técnicos que los llevan a cabo, y son los parámetros en los que más consistentemente se han encontrado variaciones en el

transcurso del tiempo (13, 20, 61). Por el contrario, la motilidad y la morfología tienen más sesgos que dependen de métodos e incluso de diferentes criterios de clasificación. En el caso de la motilidad, observamos que el porcentaje de motilidad progresiva rápida (motilidad a) disminuyó, pero se acompañó de un aumento de la motilidad b.

En conjunto, estos resultados indican que no hubo diferencias estadísticas en la motilidad progresiva (motilidad a+b) durante los 30 años (**Tabla 2**). En consecuencia, la motilidad progresiva no se modificó durante el período analizado. La motilidad progresiva se considera menos subjetiva que la clasificación de la motilidad de los espermatozoides en función de su velocidad, por lo que el análisis recomendado por la OMS generalmente se basaba en esta (1). Sin embargo, la presencia de los espermatozoides rápidamente progresivos son esenciales para la concepción (62-64), hecho recientemente señalado en la sexta edición del Manual de la OMS<sup>4</sup> por lo que es posible que el descenso de la motilidad rápidamente progresiva observado en este estudio puede tener consecuencias en la fertilidad masculina. Acerca de la variación en la morfología de los espermatozoides, este estudio encontró que el porcentaje de espermatozoides considerados normales también ha sufrido una marcada disminución, como lo establece el análisis de correlación aplicado para esta variable. Para asegurarnos de que esta asociación no es producto de cambios en los procedimientos en el análisis del semen, fue necesario segmentar la población en dos grupos: aquellos individuos estudiados entre 1988 y 2000, y los estudiados desde 2000 hasta 2019. Esta separación se justifica por los diferentes criterios de evaluación morfológica realizados en el laboratorio de andrología de Fertilab durante esos períodos.

En este sentido, se realizó un cambio mundial en estos criterios a lo largo de los años. En los últimos 25 años, los investigadores comenzaron a utilizar "criterios estrictos de Kruger" (21). Esto no solo redujo los puntos de corte considerados "normales", sino que también implicó una clasificación más estricta para catalogar a un espermatozoide como normal. En el caso de Fertilab, el cambio se ha introducido desde enero del año 2000. El análisis de ambos grupos permitió establecer una disminución del porcentaje de espermatozoides considerados normales en el tiempo, independientemente de la metodología o los criterios de clasificación.

La disminución de los parámetros espermáticos durante los últimos años se considera multicausal. La espermatogénesis en el hombre, en comparación con la de otros mamíferos, es particularmente vulnerable a factores externos y es más probable que los humanos se presenten más susceptibles frente a la situación de exposición a agentes ambientales y agentes tóxicos (23, 65). Analizamos posibles factores ambientales asociados con la disminución de los parámetros de los espermatozoides y la fertilidad de los hombres, como la edad y la obesidad (definida a través del IMC), así como la exposición a sustancias tóxicas. Nuestro estudio consideró solo a hombres sanos entre 18 y 36 años ya que este es uno de los requisitos para ser aceptado como donante de semen. Por lo tanto, no es de extrañar que tanto la edad como el IMC de los individuos no estuvieran asociados con ningún cambio en los valores de los parámetros del semen. Una disminución en los parámetros del semen se espera por encima de los 40 años de edad (31), por lo que es concordante que estos individuos considerados dentro de la categoría "jóvenes", no muestren alteraciones asociadas a esta característica. Asimismo, el IMC medio en la muestra analizada fue de 23,74 (DE  $\pm$  2,56), correspondiendo la mayoría de los individuos a la categoría de "peso normal" o "normopeso", por lo que en este estudio no se presentó la asociación ya conocida de parámetros espermáticos y un IMC alto (37). En consecuencia, la disminución observada de los valores de los parámetros del semen se produce en una población de hombres potencialmente fértiles que, por lo demás, son sanos.

Al evaluar el consumo de alcohol, tabaco y marihuana, este estudio no detectó una asociación significativa de estas características con ninguno de los parámetros de calidad del semen. El número de hombres que declaran consumir alcohol y drogas aumentó durante el período estudiado, pero no así el número de personas que indicó consumir tabaco, que mostró una disminución. Esto podría explicarse por la aplicación de políticas contra el consumo de tabaco

que, desde 2003-2004 han aumentado en Uruguay contribuyendo así a la disminución del número de fumadores (66). Sin embargo, el uso de Cannabis (droga de principal consumo en este estudio) se ha flexibilizado en Uruguay desde 2013, a partir de cuándo el consumo ha sido más aceptado, probablemente aumentando su incidencia, especialmente entre los adultos jóvenes (67). Por lo tanto, los datos recolectados en este estudio pueden reflejar los hábitos de la población uruguaya durante este período. No hemos podido establecer o estratificar la cantidad de consumo por parte de los donantes, por lo que no se pudieron determinar los posibles efectos dosis-dependientes como en otros estudios (22, 43). Sin embargo, nuestros resultados subrayan la importancia de analizar los datos en el contexto de las características geográficas y ambientales de la población.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que, en Uruguay, al igual que en otros países como Estados Unidos, países europeos y asiáticos, existe una tendencia a la disminución de la calidad del semen (13, 16, 17, 20, 23, 54, 68). Estos resultados contrastan con lo propuesto por autores como Multigner y Oliva (69) y Tortolero (56), quienes demostraron que la tendencia al deterioro de la calidad del semen no era tan marcada en países sudamericanos. Como se indicó, aunque se ha demostrado que el deterioro de la calidad espermática es un problema mundial, algunos autores sugieren que la disminución es más pronunciada en los países desarrollados e industrializados, lo que estaría explicado por cambios en factores de estilo de vida modificables (por ejemplo, dietas poco saludables, estilos de vida, y contaminación) como las principales causas (9). Sorprendentemente y a pesar de que se postulan estas diferencias regionales, existen pocos datos provenientes de otros países diferentes de Europa, EEUU o Canadá. Especialmente existen pocos datos provenientes de los países sudamericanos en este tipo de estudios. Es importante resaltar que la falta de estudios que puedan extrapolarse ampliamente a la población general de estos países, así como la existencia de pocos estudios que describan la situación actual en términos de fertilidad y calidad seminal en esta región del mundo, puede determinar un sesgo en las conclusiones cuando se los compara con los datos mundiales.

Reconocemos que existen algunas limitaciones del estudio, como por ejemplo el número de muestras consideradas se distribuye de forma heterogénea, con una mayor concentración de datos en los últimos diez años. No pudimos reconocer cuáles fueron las causas que generaron esta distribución asimétrica de la muestra, pero podrían estar relacionadas con la mayor disponibilidad y difusión de información sobre los bancos de semen y una mayor accesibilidad a los programas de donación, entre otras razones. En cuanto a la representatividad de la muestra, debemos mencionar que los datos fueron obtenidos de un solo laboratorio, considerando una población de individuos bien definida, lo que dificulta extrapolar los resultados obtenidos para otras poblaciones. El número de hombres analizados en este estudio es menor que otros que también analizaron donantes de esperma (17, 20) pero tiene la fortaleza que incluye una población definida de hombres presuntamente sanos. También destacamos la ausencia de datos sobre ocupación, exposición a factores ambientales y origen étnico, así como los datos faltantes con respecto a algunos donantes (por ejemplo, ausencia de datos sobre tabaquismo, consumo de alcohol o drogas). En el futuro, pretendemos correlacionar estos datos con una muestra pareada de personas que consultaron durante los mismos períodos no como aspirantes a participar del programa de donación, sino por problemas de fertilidad, además de agregar información sobre factores ambientales.

Por último, no creemos que la disminución de la calidad del semen a lo largo del tiempo pueda atribuirse a cambios en el personal técnico, las técnicas realizadas o el equipo utilizado para ello. Durante los 30 años del estudio, hubo pocos cambios de personal en el laboratorio. Además, Fertilab es el único banco de gametos del país y ha estado bajo el mismo comité directivo y con estrictos controles de calidad. Los técnicos tenían la misma formación, el método de estudio no sufrió grandes variaciones, excepto en el caso de la morfología (como fue analizado), y la calidad de las pruebas diagnósticas se controló periódicamente.

## **Conclusiones**

La calidad del semen en Uruguay ha disminuido en los últimos 30 años principalmente en el número de espermatozoides y la morfología de los mismos. Múltiples y variados son los factores

de riesgo que se han encontrado asociados a la calidad espermática. Ninguno de estos factores puede ser el único justificante de los dramáticos cambios en la incidencia de la infertilidad, siendo este un problema multifactorial. Es, más bien, la exposición simultánea, articulada y sumatoria a estos factores la cual tendría los efectos que se manifiestan en la calidad espermática.

Estos datos deberían ser una advertencia sobre un posible descenso de la fertilidad masculina. Debemos tener en cuenta, sin embargo, que el valor medio reportado al final de este estudio estaba por encima de los valores considerados normales por la OMS (1, 58, 59). En el futuro, será necesario hacer un seguimiento de los parámetros de los espermatozoides para comprobar si esta tendencia se verifica y se continúa, así como también identificar sus posibles causas.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Valentina Colistro, Asistente del Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina- Universidad de la República, Uruguay por su importante asistencia en el procesamiento estadístico.

## **Referencias**

1. Who. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World Health. 2010; 5:286.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med. 2012; 9:e1001356.
3. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin. Biochem. 2018 ;62:2–10.
4. Skakkebaek NE, Jørgensen N, Andersson A-M, et al. Populations, decreasing fertility, and reproductive health. Lancet. 2019; 393:1500–1501.
5. GBD 2017 Population and Fertility Collaborators. Population and fertility by age and sex for 195 countries and territories, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet. 2018; 392:1995–2051.
6. GBD 2019 Demographics Collaborators. Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950-2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet. 2020; 396:1160–1203.
7. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. Physiol. Rev. 2016; 96:55–97.
8. Fathi Najafi T, Latifnejad Roudsari R, Namvar F, et al. Air pollution and quality of sperm: a meta-analysis. Iran. Red Crescent Med. J. 2015; 17:e26930.
9. Ravanos K, Petousis S, Margioulas-Siarkou C, et al. Declining Sperm Counts... or Rather Not? A Mini Review. Obstet. Gynecol. Surv. 2018; 73:595.
10. Andrology Laboratory Manual. 2010;(http://dx.doi.org/10.5005/jp/books/11172)
11. Nelson CM, Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. Fertil. Steril. 1974; 25:503–507.
12. MacLeod J. Semen Quality in One Thousand Men of Known Fertility and in Eight Hundred Cases of Infertile Marriage. Fertil. Steril. 1951; 2:115–139.

13. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992; 305:609–613.
14. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, et al. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:281–285.
15. Irvine DS. 3 Declining sperm quality: a review of facts and hypotheses. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 1997;11:655–671.
16. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934–1996 *Environ Health Perspect* 2000; 108: 961–966.
17. Liu J, Dai Y, Li Y, et al. A longitudinal study of semen quality among Chinese sperm donor candidates during the past 11 years. *Sci. Rep.* 2020;10:1–7.
18. Benshushan A, Shoshani O, Paltiel O, et al. Is there really a decrease in sperm parameters among healthy young men? A survey of sperm donations during 15 years. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997;14:347–353.
19. Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22 759 infertile men over a 36 year period. *Hum. Reprod.* 1999;14:731–735.
20. Spingart C, Frapsauce C, Veau S. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *J. Androl.* 2012 [electronic article]. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2605.2011.01229.x>)
21. Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, et al. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil. Steril.* 2010;94:2898–2901.
22. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, et al. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur. Urol.* 2016;70:635–645.
23. Rahban R, Nef S. Regional difference in semen quality of young men: a review on the implication of environmental and lifestyle factors during fetal life and adulthood. *Basic Clin Androl.* 2020;30:16.
24. Jensen TK, Gottschau M, Madsen JOB, et al. Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. *BMJ Open.* 2014;4:e005462.
25. De Brucker S, Drakopoulos P, Dhooghe E, et al. The effect of cigarette smoking on the semen parameters of infertile men. *Gynecol. Endocrinol.* 2020;36:1127–1130.
26. Dunphy BC, Barratt CL, von Tongelen BP, et al. Male cigarette smoking and fecundity in couples attending an infertility clinic. *Andrologia.* 1991;23:223–225.
27. Said TM, Grunewald S, Paasch U, et al. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil. Steril.* 2005;83:1442–1446.
28. Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *J. Androl.* 2012;33:515–528.
29. Mann U, Shiff B, Patel P. Reasons for worldwide decline in male fertility. *Curr. Opin. Urol.* 2020;30:296–301.
30. Cedars MI. Introduction: Childhood implications of parental aging. *Fertil. Steril.* 2015;103:1379–1380.



31. Verón GL, Tissera AD, Bello R, et al. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil. Steril.* 2018;110:68–75.e4.
32. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, et al. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* 2015;19:22–33.
33. Paparella C, Pavesi A, Provenzal O, et al. Infertilidad masculina. Exposición laboral a factores ambientales y su efecto sobre la calidad seminal. *Revista Uruguaya de Medicina Interna.* 2017;2:10–21.
34. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol.* 2018;16:10–20.
35. Rago R, Salacone P, Caponecchia L, et al. The semen quality of the mobile phone users. *J. Endocrinol. Invest.* 2013;36:970–974.
36. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, et al. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil. Steril.* 2008;89:124–128.
37. Aguilar-Roa P, Echavarría-Sánchez M. Relación circunferencia abdominal e insulinorresistencia y su impacto en parámetros seminales. *Perinatol. Reprod. Hum.* 2016;30:75–81.
38. Suliga E, Gluszek S. The relationship between diet, energy balance and fertility in men. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2020;90:514–526.
39. Bentley J. U.S. Trends in Food Availability and a Dietary Assessment of Loss-adjusted Food Availability, 1970-2014. United States Department of Agriculture, Economic Research Service; 2017 32 p.
40. World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2018. World Health Organization; 2019 469 p.
41. Carroll K, Pottinger AM, Wynter S, et al. Marijuana use and its influence on sperm morphology and motility: identified risk for fertility among Jamaican men. *Andrology.* 2020;8:136–142.
42. Payne KS, Mazur DJ, Hotaling JM, et al. Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *J. Urol.* 2019;202:674–681.
43. Maris E, Huberlant S, Torre A. Tabaco y fertilidad. *EMC - Ginecología-Obstetricia.* 2017;53:1–5.
44. Asare-Anane H, Bannison SB, Ofori EK, et al. Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reprod. Health.* 2016;13:90.
45. Bundhun PK, Janoo G, Bhurtu A, et al. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2019;19:36.
46. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018;16:3.
47. Dai J-B, Wang Z-X, Qiao Z-D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J. Androl.* 2015;17:954–960.
48. Hamad M, Shelko N, Montenarh M, et al. The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. *Hum. Fertil.* . 2019;22:104–110.
49. Bahadur G, Ling KLE, Katz M. Andrology: Statistical modelling reveals demography and time are the main contributing factors in global sperm count changes between 1938 and 1996. *Hum. Reprod.* 1996;11:2635–2639.

50. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2017;23:646–659.
51. Sengupta P, Nwagha U, Dutta S, et al. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. *Afr. Health Sci.* 2017;17:418–427.
52. Sengupta P, Dutta S, Krajewska-Kulak E. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *Am. J. Mens. Health.* 2017;11:1279–1304.
53. Siqueira S, Ropelle AC, Nascimento JAA, et al. Changes in seminal parameters among Brazilian men between 1995 and 2018. *Scientific Reports.* 2020;10(1). (<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63468-9>)
54. Borges E Jr, Setti AS, Braga DP de AF, et al. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. *Int. Braz J Urol.* 2015;41(4):757–763.
55. Molina RI, Martini AC, Tissera A, et al. Semen quality and aging: analysis of 9.168 samples in Cordoba. Argentina. *Arch. Esp. Urol.* 2010;63:214–222.
56. Tortolero I, Bellabarba Arata G, Lozano R, et al. SEMEN ANALYSIS IN MEN FROM MERIDA, VENEZUELA, OVER A 15-YEAR PERIOD. *Arch. Androl.* 1999;42:29–34.
57. Barrera N, Ordoqui R, Montes JM, et al. The Uruguayan semen donor population: A twenty-eight-year retrospective study. *Andrologia.* 2020;52:e13502.
58. Who. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical Interactions. Distributed by WHO Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction. 1980;
59. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press; 1999 128 p.
60. Kruger TF, Swanson RJ, Hamilton M, et al. Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. *Int. J. Androl.* 1988;11:107–113.
61. Gyllenborg J, Skakkebaek N, Nielsen N. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *J. Androl.* [electronic article]. 1999;(<https://insights.ovid.com/international-andrology/ijan/1999/02/000/secular-seasonal-changes-semen-quality-among-young/6/00004327>)
62. Barratt CLR, Björndahl L, Menkveld R, et al. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum. Reprod.* 2011;26:3207–3212.
63. Aitken RJ, Sutton M, Warner P, et al. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1985;73:441–449.
64. Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1986;78:93–102.
65. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2010;365(1546):1697–1712.
66. Gravely S, Fong GT, Driezen P, et al. The impact of the 2009/2010 enhancement of cigarette health warning labels in Uruguay: longitudinal findings from the International Tobacco

Control (ITC) Uruguay Survey. *Tob. Control.* 2016;25:89–95.

67. Hall W, Lynskey M. Assessing the public health impacts of legalizing recreational cannabis use: the US experience. *World Psychiatry.* 2020;19:179–186.

68. Mehta J, Woodward B. *Male Infertility: Sperm Diagnosis, Management and Delivery.* JP Medical Ltd; 2014 135 p.

69. Multigner L, Oliva A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad. Saude Publica.* 2002;18:403–412.

*Revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

# ESTUDIOS GLOBALES EN ANDROLOGÍA: DE LA INVESTIGACIÓN AL LABORATORIO CLÍNICO

Mónica Hebe Vazquez-Levin

Gustavo Luis Verón

Ania Antonella Manjon

Camila Mariatti

Débora Catalano

Laboratorio de Estudios de Interacción Celular en Reproducción y Cáncer. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) - Fundación IBYME (FIBYME). Buenos Aires, Argentina.

Autor correspondiente: Dra. Mónica Vazquez-Levin. Correo electrónico: mhvazl@gmail.com

La infertilidad afecta globalmente a 15-20% de las parejas en edad reproductiva (1) y se caracteriza por la incapacidad de concebir naturalmente tras un año de relaciones sexuales sin uso de anticonceptivos durante la fase fértil del ciclo menstrual (2). Esta enfermedad puede ser definida como primaria y secundaria, correspondiendo la primera a aquellas personas que nunca concibieron, mientras que la segunda a aquellas personas con al menos una concepción previa. Alrededor del 35% de los casos se debe a factores masculinos, 35% a femeninos, un 20% a factores combinados, y el 10% restante es de origen aún no asignable por limitaciones en el diagnóstico (2,3,4).

La evaluación de la fertilidad masculina comprende la realización de la evaluación exhaustiva de la historia clínica del paciente, su salud física general y reproductiva y, finalmente, el análisis de semen. Este último permite obtener información relevante sobre la funcionalidad testicular, de las glándulas accesorias, así como la capacidad eyaculatoria de la persona (5,6). Provee información sobre el volumen de eyaculado y algunos parámetros físico-químicos, así como la cantidad (concentración y cuenta) de espermatozoides presentes en el eyaculado, como su movilidad y morfología. En este sentido, una concentración y cuenta espermática menor a la definida como normal (oligozoospermia), así como la presencia de alteraciones en el porcentaje de espermatozoides móviles (astenozoospermia) y morfológicamente normales (teratozoospermia) han sido asociados a una baja tasa de éxito en la fecundación (7). Sin embargo, el análisis seminal solo puede predecir la fertilidad indiscutiblemente en casos de azoospermia, definidos por eyaculados con ausencia de espermatozoides (7-9). Las limitaciones en el diagnóstico de la infertilidad masculina podrían atribuirse, al menos en parte, a una falla en la comprensión de las bases moleculares de la infertilidad, ya que se estima que solo entre un 6 y 27% de los hombres con infertilidad presentan parámetros seminales dentro de los valores definidos como normales (normozoospermia) (10,11), por lo que resulta de gran importancia identificar marcadores moleculares que permitan establecer las causas de la infertilidad para así poder mejorar el diagnóstico actual y ofrecer tratamientos personalizados en cada caso.

En el área de la medicina reproductiva, existen pruebas complementarias al análisis de rutina del semen, entre las que se destaca el estudio de la fragmentación del ADN, y pruebas adicionales, como el cariotipo, la detección de microdeleciones ligadas al cromosoma Y, y el estudio de mutaciones en genes específicos asociados a patologías moleculares ya establecidas (12,13).

En las últimas décadas, el avance tecnológico en técnicas de biología molecular y su asequibilidad creciente ha permitido la identificación de potenciales biomarcadores a través de

abordajes de estudios globales o de las ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). Las ómicas son disciplinas que estudian eventos e interacciones de entidades moleculares, estructuras celulares y procesos biológicos desde el ADN hasta su expresión y la función de las entidades resultantes. La genómica estudia el conjunto completo de genes de un individuo (14), mientras que la transcriptómica evalúa el contenido total de transcritos o ácidos ribonucleicos (ARNs), ofreciendo información sobre los perfiles de expresión en células o tejidos (15), y la proteómica el conjunto de las proteínas resultantes (16). Desde el área de la genómica y transcriptómica, el rápido desarrollo de tecnologías de alto rendimiento, caracterizadas por el análisis de una gran cantidad de muestras y datos mediante microarreglos de ADN y secuenciación de ADN y ARN, ha resultado en la caracterización exitosa de mutaciones a nivel genómico y del perfil de expresión a nivel de transcritos de varios organismos y tipos celulares. Este conocimiento llevó a un enriquecimiento en el entendimiento de varias patologías y sus bases moleculares. A estas disciplinas se han sumado otras ómicas, que analizan modificaciones epigenéticas y genéticas que regulan el transcriptoma y el proteoma, y más recientemente la glicómica, lipidómica, y metabolómica, entre otras. En conjunto, las ómicas permiten estudiar el comportamiento normal y las alteraciones fenotípicas a fin de evaluar a los sistemas biológicos desde un enfoque de la fisiología normal y anormal. Y a la aplicación del concepto de medicina personalizada, que hace referencia al abordaje personalizado del tratamiento de un paciente considerando un conjunto de datos que permiten predecir su respuesta a distintos tratamientos (17), y que comenzó a utilizarse a principios del siglo XXI luego de la publicación del “*Human Genome Project*” en el año 2003 (18).

Asimismo, las bases de datos originadas a partir de estos estudios resultan cada vez mayores, involucrando grandes tamaños muestrales para la obtención de resultados estadísticamente significativos. A su vez, estos estudios están contenidos en repositorios a gran escala destinados a la investigación clínica y translacional, que han crecido a nivel mundial en los últimos años y contienen información proveniente de estudios de análisis de expresión global, así como también información clínica de los pacientes involucrados en los mismos. El crecimiento constante de los repositorios de literatura hizo imperativo el uso de herramientas computacionales para identificar información relevante y ponerla en el contexto del conocimiento biomédico actual. Por este motivo, se han desarrollado numerosas herramientas, entre ellas DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), una plataforma que contiene información acerca de asociaciones entre genes y enfermedades humanas (19,20) y que ha sido ampliamente empleada en el estudio de las enfermedades y sus mecanismos moleculares subyacentes. Este crecimiento sostenido de la información biomédica fue acompañado de abordajes integradores tales como la bioinformática translacional, disciplina enfocada en la convergencia de bioinformática molecular, bioestadística, genética estadística e informática clínica, para transformar la información en conocimiento y así profundizar en los mecanismos subyacentes a las enfermedades y proveer información útil para la práctica clínica. Actualmente, la bioinformática se enfrenta a nuevos desafíos en la investigación translacional. La bioinformática translacional se ha propuesto y desarrollado como un nuevo campo en la investigación biomédica (21,22). El descubrimiento de conocimiento impulsado por el fenómeno de *big data*, definida como el conjunto de grandes cantidades de datos devenidos del uso de tecnologías de alto rendimiento, es el nuevo paradigma para la medicina translacional (23).

Específicamente en lo que concierne a la Salud Reproductiva Masculina, las ómicas se han comenzado a aplicar en años recientes, permitiendo estudiar de manera global y en mayor detalle los aspectos moleculares de la gameta masculina, así como describir los perfiles genómicos, transcripcionales y proteicos de pacientes para identificar biomarcadores de infertilidad y elegir estrategias compatibles con su diagnóstico. Finalmente, la integración de los datos recabados con las diversas ómicas en bases de datos de multi-ómicas, han permitido iniciar un acercamiento de la patología de la infertilidad masculina a la era de la medicina personalizada (24-26).

En el presente capítulo se reseñarán algunos avances en genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, glicómica y lipidómica y algunas herramientas bioinformáticas asociadas al estudio de la salud reproductiva masculina (**Figura**).

## **Genómica**

El potencial fértil masculino puede verse afectado por diversos factores, entre los que se destacan factores intrínsecos, como son la obstrucción del tracto genital masculino, fallas en la espermatogénesis o resistencia a hormonas, generalmente asociadas a alteraciones genéticas

(27,28) y factores extrínsecos como pueden ser la exposición a tóxicos, consumo de cigarrillo o alcohol, y condiciones medio-ambientales deletéreas (29,30).

Las alteraciones genéticas que podrían impactar sobre la fertilidad humana resultan, en algunos casos, de aberraciones estructurales o numéricas a nivel cromosomal, y mutaciones a nivel génico (31). Las pruebas genéticas más utilizadas incluyen el estudio del cariotipo para las detecciones de aberraciones numéricas o estructurales a nivel cromosómico y evaluación de la presencia de microdeleciones en el cromosoma Y (empleando PCR multiplex de marcadores de sitio etiquetados con secuencia mapeadas dentro de regiones específicas (32). Las alteraciones cromosómicas representan el 7% de las causas de fallas en la espermatogénesis (33). A modo de ejemplo, el síndrome de Klinefelter, determinado por un cariotipo 47 XXY, se caracteriza por la expresión de un fenotipo masculino eunucoide con azoospermia (34,35), y representa el 14% de los casos de azoospermia (36). Por otro lado, las microdeleciones del cromosoma Y se encuentran en el 10% de individuos con azoospermia obstructiva (OA) y en el 5% de individuos con oligozoospermia severa (37). Las microdeleciones frecuentes en la región del factor de azoospermia (AZF) del cromosoma Yq están asociadas con fallas en la espermatogénesis. Hay tres regiones distintas en AZF, AZFa, AZFb y AZFc, cada una de las cuales contiene varios genes para una variedad de funciones. AZFa se encuentra más proximal al centrómero, seguido de AZFb y, más distalmente, AZFc (38). Las deleciones graves de AZFa y AZFb no son transmisibles, mientras que los hombres con deleciones de AZFc comúnmente requerirán técnicas de reproducción médica asistida (TRMA).

El hallazgo de asociaciones entre la infertilidad y fenotipos asociados permite un mejor diagnóstico, manejo y tratamiento de las parejas en consulta por infertilidad. Asimismo, la identificación de estas alteraciones también permite determinar los riesgos a nivel hereditario por *screening* preconcepcional, y así optimizar las TRMA a emplear (39). Dado el amplio repertorio de entidades involucradas en el desarrollo del potencial fértil, resulta difícil la identificación de las causas genéticas de la infertilidad en la mayoría de los casos. Sin embargo, con las nuevas tecnologías para la secuenciación masiva de ADN y el acompañamiento por el desarrollo de abordajes bioinformáticos para su estudio, existe una creciente evidencia sobre distintos conjuntos de genes asociados a distintas causas genéticas de la infertilidad (40).

Uno de los desafíos presentes a la hora de discernir en qué conjunto de genes resulta óptimo el estudio de alteraciones genéticas asociadas a la infertilidad, es la distinción entre infertilidad sindrómica o no sindrómica. La infertilidad sindrómica se refiere a aquella devenida como una manifestación dentro de un conjunto de alteraciones inherentes a un síndrome particular (40), mientras que la no sindrómica se refiere al fenotipo de infertilidad sin otras manifestaciones clínicas relevantes (41). Dentro de la infertilidad sindrómica se destacan el hipopituitarismo, el síndrome endócrino caracterizado por la reducción o ausencia de una o más hormonas pituitarias, el hipogonadismo hipogonadotrófico, caracterizado por bajos niveles de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), y la disquinesia ciliar primaria, asociada a la astenozoospermia (42).

Dentro de las alteraciones genómicas, se ha determinado que existen variantes estructurales con cambios en el número de copias ADN específico (CNV, del inglés *copy number variation*), y son las principales causas de variabilidad cuantitativa del genoma humano debida a la eliminación o duplicación de la secuencia original, sin ningún tipo de mutación. En este sentido, un estudio de análisis de perturbaciones espermatogénicas reveló que los CNV ligadas al cromosoma X se asocian más con hombres infértiles que los controles (43). Así, la eliminación de CNV67 afecta a MAGEA9, un gen en el cromosoma X que se expresa específicamente en el testículo bajo condiciones fisiológicas (44). Sin embargo, es de destacar que además de los genes ligados al cromosoma X, se han identificado varios *loci* autosómicos que pueden afectar la fertilidad masculina como consecuencia de los CNV (45).

Además de los CNV, los polimorfismos genéticos de nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) son variaciones genómicas en las que dos o más genotipos o alelos están presentes simultáneamente en una población. Los SNP son variaciones causadas por mutaciones en una sola posición en una secuencia de ADN. La mayoría de las variantes genéticas asociadas a la infertilidad masculina se encuentran en los cromosomas sexuales (46). También se han identificado otros polimorfismos autosómicos. Por ejemplo, los SNP en el gen que codifica para la enzima metileno-tetra-hidro-folato reductasa (*MTHFR*), un componente clave en el metabolismo del folato, contribuyen a un mayor riesgo de infertilidad masculina (47). Las alteraciones en el gen que codifica la enzima ADN polimerasa gamma (*POLG*), una enzima responsable de la replicación y reparación del ADN mitocondrial, también están asociadas a la

disfunción espermática; sin embargo, el papel de POLG en la infertilidad masculina sigue siendo cuestionado (48). Los SNP en los genes *MMR*, vía que juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma, recombinación meiótica y gametogénesis, reducen la función *MMR* y pueden conducir a mutaciones en otros genes. Específicamente la presencia de SNPs en los genes *MMR* (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH4*, *MSH5* y *MSH6*) se ha asociado a la infertilidad masculina (49).

Entre las alteraciones en el semen, la azoospermia o ausencia de espermatozoides en el eyaculado afecta al 1% de la población masculina y se corresponde con el 20% de los casos de infertilidad en el hombre (50). Su origen puede deberse a la obstrucción del tracto reproductor masculino (OA), o a fallas en la espermatogénesis (azoospermia no obstructiva, NOA). En la NOA, un estudio reciente ha identificado un conjunto de variantes de nucleótido simple en los genes: *ESX1*, *TEX13A*, *TEX14*, *DNAH1*, *FANCM*, *QRICH2*, *FSIP2*, *USP9Y*, *PMFBP1*, *MEI1*, *PIWIL1*, *WDR66*, *ZFX*, *KCND1*, *KIAA1210*, *DHRXS*, *ZMYM3*, *FAM47C*, *FANCB*, *FAM50B* (genes previamente asociados a infertilidad), *TKTL1*, *IGSF1*, *ZFPM2*, *VCX3A* (variantes nóveles causales de enfermedades), y *ALG13*, *BEND2*, *BRWD3*, *DDX53*, *TAF4*, *FAM47B*, *FAM9B*, *FAM9C*, *MAGEB6*, *MAP3K15*, *RBMXL3*, *SSX3* y *FMR1N*, genes que podrían estar involucrados en la espermatogénesis (51). Por su parte, en la OA, la ausencia congénita de los conductos deferentes (CAVD, del inglés *congenial agenesis of vas deferens*) es una de las principales causas, y las mutaciones en los genes *CFTR* y *ADGRG2* causan la mayoría de las agenesias. A pesar de esto, el 10%-20% de los pacientes con CAVD permanecen sin un diagnóstico genético claro (52).

En los pacientes en los que se identifica la presencia de teratozoospermia, se destacan la macrozoospermia y la globozoospermia. La macrozoospermia tiene una incidencia menor al 1% en hombres con infertilidad, y se caracteriza por la presencia de espermatozoides con cabezas de gran tamaño y múltiples flagelos (53). Las causas principales de la macrozoospermia se asocian a mutaciones en el gen *AURKC*, cuya forma proteica se encuentra involucrada en la segregación de cromosomas y en la citoquinesis (54). Por otro lado, la globozoospermia se caracteriza por la presencia de espermatozoides con la cabeza redondeada y sin acrosoma, acompañados por defectos en la pieza media y alteraciones en la membrana nuclear (53). Este fenotipo se encuentra asociado a mutaciones en los genes *SPATA16* y *DPY19L2*. El primero codifica para una proteína específica del aparato de Golgi enriquecida en testículo, y el segundo para una proteína necesaria para la elongación de la cabeza del espermatozoide y la formación del acrosoma durante la espermatogénesis (42). Y estudios recientes han identificado nuevos genes relacionados a esta patología altamente compleja (55).

Con respecto a la astenozoospermia, su origen puede deberse a alteraciones en el axonema, mitocondria u otras estructuras del flagelo (56). Específicamente, se la ha asociado a mutaciones en los genes *DNAH1*, *CFAP43*, *CFAP44*, *SLC26A8*, *CATSPER1*, *SEPT12*, *CFAP43*, *CFAP44*, *DNAH1* y *PLCZ1* (42).

Contrastando con las patologías arriba mencionadas, en casos de infertilidad idiopática no existe un claro trasfondo genético que permita sospechar alteraciones genéticas puntuales, lo que dificulta su análisis por cariotipo o genes individuales. En este aspecto, la utilización reciente de la secuenciación de nueva generación (NGS; *next-generation sequencing*) representa una alternativa para mejorar y personalizar el diagnóstico de la infertilidad masculina mediante el análisis simultáneo de una gran cohorte de individuos y el *screening* de múltiples genes y variantes (39). Un estudio reciente de análisis de asociación genómica (*genome-wide association study*) delineó una región genómica polimórfica de *FSHB* como el principal determinante de los niveles de FSH en hombres con infertilidad idiopática. Dado el papel esencial de la FSH, la detección molecular de una de las variantes de nucleótido simple identificadas que causan la disminución de la FSH y, por lo tanto, disminuye la espermatogénesis, podría resolver el origen inexplicado por este factor etiológico (57).

Si bien todavía se carece de un consenso con respecto a los genes más representativos de cada fenotipo asociado a infertilidad, existen evidencias del aporte de paneles para asistir en el diagnóstico y terapéutica de la infertilidad. En este sentido, el avance en el diseño de paneles específicos se ha enfocado recientemente en genes involucrados en la etiología de distintas anomalías seminales, como son la azoospermia, teratozoospermia y astenozoospermia. El diseño de paneles específicos permite restringir el universo a explorar, al analizar las causas genéticas de la infertilidad en ciertas subpoblaciones. A diferencia de los estudios de microarreglos de ADN que proveen medidas promedio de la expresión de transcritos, la secuenciación de nueva generación permite la cuantificación a nivel de bases individuales. Si bien la NGS permite el estudio simultáneo de una gran cantidad de genes y muestras, su procesamiento, almacenamiento e

interpretación pueden resultar un desafío a la hora de encontrar nuevos potenciales biomarcadores. Esta capacidad trae aparejada la necesidad de visualizar estos resultados únicamente dentro de un marco genómico con herramientas específicas. Por lo tanto, se ha iniciado el desarrollo de plataformas que compilan la información recabada por los estudios genómicos y de otras ómicas, como es el repositorio *Male Infertility Knowledgebase* (MIK; <http://mik.bicnirrh.res.in/>) (58), que integra información sobre ~17 000 genes, sus vías asociadas, ontología génica, enfermedades y herramientas de análisis basadas en genes y secuencias y desarrollado para impulsar la investigación sobre la etiología genética de la infertilidad masculina. Además, incorpora información sobre aberraciones cromosómicas y asociaciones sindrómicas con la infertilidad masculina. Asimismo, *ReproGenomics Viewer* (RGV; <http://rgv.genouest.org>) (59), es un entorno de trabajo de especies múltiples y cruzadas para la visualización, extracción y comparación de conjuntos de datos ómicos publicados para la comunidad científica reproductiva. A partir de toda esta información compilada, el diseño y validación de paneles se podrá constituir en una herramienta fundamental para facilitar el acceso y el manejo de la información a nivel génico, adaptándose a la demanda para la terapéutica y adecuándose a las tecnologías que se aplican en otros campos de la medicina de precisión en infertilidad masculina.

## Epigenómica

La epigenómica estudia los cambios epigenéticos en una célula, sin alterar la secuencia del ADN (60). La metilación del ADN y la modificación de histonas se encuentran entre los procesos epigenéticos mejor caracterizados (60). Asimismo, se ha involucrado a los ARN largos no codificantes (lncRNAs) y otros ARN no codificantes en la inducción de cambios epigenéticos (61). El mantenimiento epigenómico es un proceso continuo y juega un papel importante en la estabilidad de los genomas eucariotas al participar en mecanismos biológicos cruciales como la reparación del ADN (62).

La metilación del genoma es un proceso reversible y heredable, y se caracteriza por una modificación química covalente en los dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) que se encuentran en altas concentraciones cerca de los promotores de los genes. Las 'islas CpG' están ubicadas en diferentes regiones metiladas (DMR, del inglés *differentially methylated regions*) de genes, y su metilación difiere entre los alelos paternos y maternos, lo que influye en la transcripción de genes (63). La metilación ocurre durante el desarrollo embrionario y está implicada en numerosos procesos fisiológicos, como la impronta o "*imprinting*" genómica, la inactivación del cromosoma X y la expresión génica diferencial. Después de la fecundación, los alelos paternos se desmetilan activamente, mientras que el ADN materno sufre una desmetilación pasiva. Las primeras fases de la espermatogénesis se caracterizan por una reorganización que implica metilación del ADN, que se mantiene durante la meiosis y el posterior desarrollo de las gametas, afectando únicamente a genes específicos. Los llamados "genes impresos" escapan a la reprogramación epigenética después de la fecundación, lo que conduce al mantenimiento de la metilación del ADN de los espermatozoides en el embrión en desarrollo. La persistencia de patrones de línea germinal específicos de los padres podría justificar la participación epigenética en el riesgo potencial para la descendencia durante la TRMA (64).

Después de la meiosis, las células germinales experimentan varios reordenamientos de la cromatina, especialmente el reemplazo de histonas por protaminas, que son proteínas básicas pequeñas nucleares específicas del espermatozoide responsables de la condensación del genoma haploide (65). La relación entre las protaminas y el ADN da como resultado una remodelación estructural y molecular significativa del ADN espermático en las estructuras toroidales de nucleoprotamina. La interacción protamina-ADN no solo facilita la morfología normal y la forma hidrodinámica de la cabeza del espermatozoide, sino que también a la protección del ADN contra la oxidación y fragmentación (65,66). Dado que en los espermatozoides maduros el ADN está densamente empaquetado con protaminas y el genoma materno está densamente empaquetado con histonas, la estructura altamente condensada de la nucleoprotamina debe desempaquetarse y reorganizarse en una estructura nucleosomal durante la fecundación (67).

Es por esto que las modificaciones epigenéticas incorrectas durante cada etapa de estos procesos pueden conducir a la infertilidad masculina severa. Los estudios iniciales revelaron que la hipermetilación del ADN, especialmente en las regiones promotoras de los genes *PLAG1*, *PAX8*, *DIRAS3*, *MEST*, *SFN*, *NTF3* y *HRAS*, podían estar asociadas con una disminución en el conteo, la motilidad y la morfología normal de los espermatozoides (68). También se encontró que el gen *H19* estaba hipometilado en hombres con teratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia (69). El gen



*H19* es parte de un grupo de genes en el brazo corto (p) del cromosoma 11 que se somete a *imprinting* genómico, y también está involucrado en el crecimiento y desarrollo (70). Posteriormente, un estudio comparó la metilación CpG de los genes *LIT1*, *SNRPN*, *MEST*, *H19*, *PLAGL1*, *PEG3* e *IGF2* en espermatozoides de hombres fértiles e infértiles, e identificó una relación significativa entre la alteración de la espermatogénesis y la hipermetilación de los genes, excepto en el gen *IGF2* (71).

En un trabajo de recapitulación reciente, Rotondo y colaboradores (72) indicaron que las investigaciones publicadas respaldan la hipótesis de que la metilación del ADN espermático está asociada con alteraciones espermáticas que pueden afectar a varios parámetros del semen y se asocian a infertilidad. En el metanálisis de ensayos clínicos controlados que comparan hombres con infertilidad idiopática con controles fértiles, se incluyeron veinticuatro estudios. Como resultado, los niveles de metilación del gen *H19* resultaron significativamente más bajos en hombres infértiles. Por su parte, el nivel medio de metilación de los genes *MEST* y *SNRPN* fue significativamente mayor en hombres infértiles. Y los niveles de metilación del gen *LINE-1* no difirieron entre hombres infértiles y controles.

En cuanto a los ARNs no codificantes pequeños (sncRNA, del inglés *small non coding RNA*), trabajos recientes mostraron cambios dinámicos en los espermatozoides a medida que transitan a través del entorno testicular hacia los segmentos del epidídimo. Los estudios demostraron que los cambios están mediados por los epididimosomas durante el tránsito a través del conducto adluminal en el epidídimo, y los cambios en el contenido de sncRNA de los espermatozoides se derivan de agresiones ambientales que alteran significativamente el desarrollo embrionario temprano y predisponen a la descendencia a trastornos metabólicos (73). En la siguiente sección se mencionarán otros antecedentes sobre los ARN no codificantes (ncRNA).

Un conocimiento profundo del estado de metilación del ADN espermático en asociación con un potencial reproductivo reducido podría mejorar el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para esta enfermedad. Teniendo en cuenta el uso generalizado de las TRMA, la metilación del ADN de genes específicos implicados en la espermatogénesis adquiere una relevancia clínica cada vez mayor, lo que representa una posible explicación del aumento de la incidencia de síndromes relacionados con la impronta genómica en embarazos asistidos médicamente.

## Transcriptómica

Como se mencionó previamente, la transcriptómica es el estudio del transcriptoma, término que incluye el conjunto de todas las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) expresadas en una célula, tejido u organismo (74). Durante mucho tiempo, el dogma central de la biología molecular asumió que un gen se transcribía en un ARN mensajero (ARNm), que a su vez se traducía en una proteína que cumplía una o varias funciones estructurales, biológicas y/o reguladoras dentro de la célula. Sin embargo, ahora está claro que el transcriptoma es una maquinaria mucho más compleja, compuesta por varias clases de ARN que realizan una miríada de funciones. Es así como un gran porcentaje de los genes humanos contienen más de un exón empalmado de forma alternativa (75) y, por lo tanto, pueden producir numerosas formas de ARN y proteínas.

Según lo indican diferentes estudios, el testículo es el órgano que expresa mayor cantidad de genes y proteínas tejido-específico (76-78) y un mayor número de eventos de *splicing* alternativo en numerosos genes (79-82). Además, los genes expresados en la gonada masculina muestran una mayor tasa de divergencia entre especies tanto a nivel génico como proteico (83). Estas características se atribuyen a la selección sexual por medio de la cual se ejerce una presión de selección específica que permite que se den mutaciones que provean una ventaja reproductiva transmisible más fácilmente a la progenie, fijándose así relativamente más rápido (84). Para poder generar espermatozoides móviles capaces de fecundar, las células germinales del testículo llevan a cabo el proceso de espermatogénesis durante el cual deben realizar la meiosis y la espermiogénesis. Este es un proceso de diferenciación extremo que involucra factores moleculares específicos de funciones, muchos de ellos expresados durante la espermatogénesis (84).

Además, durante la evolución de las especies euterias, el cromosoma Y se acortó progresivamente, impidiendo el alineamiento entre los cromosomas X e Y en la profase I de la meiosis; por este motivo, para prevenir los alineamientos y recombinaciones defectuosas, los cromosomas sexuales se condensan en una estructura nuclear específica llamada cuerpo XY

(85,86) cuya alta condensación lleva al silenciamiento transcripcional completo durante esta etapa (87), en un proceso conocido como inactivación meiótica de los cromosomas sexuales. Para compensar el cese de transcripción de genes cruciales para las células, un gran número de genes ligados al X se han transpuesto a cromosomas autosómicos durante la evolución, adquiriendo una expresión meiótica y post-meiótica específica (88,89). Por último, debido a la heterocigosis de los cromosomas sexuales en machos que permite que rasgos reproductivos ventajosos se fijen más rápidamente, los genes ligados al cromosoma X se encuentran sobreexpresados entre aquellos que se expresan preferencialmente en células somáticas testiculares espermatogonias y espermátides post-meióticas (90). Las especificaciones mencionadas respecto del programa de expresión de la célula germinal masculina hacen de este un ambiente rico para estudiar los mecanismos reguladores de la expresión génica a diferentes niveles, así como el descubrimiento de nuevos genes e isoformas proteicas (84).

El análisis global de los ARN mensajeros (ARNm) de los espermatozoides y del testículo ha permitido cuantificar la expresión de miles de genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *differentially expressed genes*) en una única muestra, y de esta manera avanzar hacia un mejor entendimiento de las bases moleculares del potencial fértil del hombre, así como la identificación de nuevos biomarcadores que se relacionen con la infertilidad masculina (91,92). En este sentido, una de las tecnologías más ampliamente utilizadas para el estudio de la transcriptómica son los microarreglos de ADN, tecnología a partir de la cual se han podido identificar alteraciones en los perfiles de transcripción de eyaculados de pacientes con anomalías en la calidad seminal. En estudios publicados en 2007, se determinó que los genes *RBM1*, *DAZ1*, *TSPY1* y *DDX3Y* se encontraban diferencialmente expresados en varones con oligozoospermia o azoospermia en comparación con controles de individuos normozoospermicos (93). Por su parte, Montjean y colaboradores (94) estudiaron el transcriptoma en espermatozoides de pacientes con oligozoospermia y lo compararon con el de individuos normozoospermicos; como resultado, identificaron 157 transcritos sobre/infraexpresados, y el 83 % de los genes regulados se encontraron al menos 2 veces infraexpresados en los pacientes infértiles. Asimismo, observaron una reducción de hasta 43 veces en la expresión de genes implicados en la espermatogénesis y motilidad de los espermatozoides, así como asociados a procesos antiapoptóticos de las células germinales (*PRM2*, *SPZ1*, *SPATA-4*, *MEA-1*, *CREM*).

Utilizando también la tecnología de microarreglos de ADN, Jodar y colaboradores (95) analizaron la expresión de transcritos en espermatozoides de pacientes astenozoospermicos y donantes fértiles. Como resultado, se identificaron varios transcritos presentes en diferente abundancia en los pacientes en comparación con los controles. Y validaron la expresión diferencial de tres de los transcritos detectados (*ANXA2*, *BRD2* y *OAZ3*), mediante PCR en tiempo real en un conjunto mayor de muestras, identificándose una correlación positiva entre la expresión de estos transcritos y la motilidad progresiva.

A fin de determinar si la expresión de genes testiculares sirve para definirlos como biomarcadores predictivos de la presencia de espermatogénesis en pacientes con NOA, Hashemi y colaboradores estudiaron la expresión del gen *ZMYND15* y los genes blanco *TNP1*, *PRM1* y *SPEM1* en biopsias testiculares de pacientes con NOA y en pacientes con OA. Los niveles de estos transcritos también se compararon en muestras de pacientes azoospermicos con recuperación de espermatozoides positiva y negativa. Como resultado, el nivel de expresión de los genes estudiados fue significativamente menor en las muestras testiculares de pacientes con NOA. De manera similar, los niveles de expresión de estos transcritos fueron menores en las muestras con recuperación espermática negativa frente a la positiva. Los autores concluyeron que el nivel de expresión de *ZMYND15* puede tener potencial para predecir una recuperación exitosa con una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 60 % para la población total y una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 75 % para NOA. En un estudio posterior del mismo grupo realizado sobre 63 hombres azoospermicos (16 OA y 47 NOA sometidos a microdissección de tejido testicular) se estudiaron siete marcadores moleculares *ESX1*, *DAZ*, *DAZL* (marcadores premeióticos) y *ZMYND15*, *PRM1*, *TNP1* y *SPEM1* (marcadores posmeióticos) para predecir el éxito de la recuperación de espermatozoides. Como resultado, se determinó que *SPEM1* fue el gen con el mejor poder positivo (96 %) y negativo (85 %) para predecir el resultado de microdissección de tejido testicular (96).

Los estudios globales del transcriptoma también han sido empleados en pacientes sometidos a diferentes TRMA, para comparar los perfiles de expresión de aquellos que obtuvieron un embarazo exitoso o no, y así poder trasladar los resultados a la clínica. En particular, se compararon los perfiles de transcripción de grupos de pacientes que realizaron una inseminación

intrauterina, y se encontraron diferencias de expresión entre aquellos que lograron el embarazo respecto de los que no lo lograron. Como resultado, en el grupo de los pacientes que lograron embarazo, se identificaron 756 genes con expresión aumentada y 741 con expresión exclusiva, mientras que solo 194 genes presentaron expresión aumentada en el grupo que no logró embarazo y 976 de expresión exclusiva. Dentro de los transcritos diferencialmente expresados, se identificó una expresión exclusiva del gen *BCL-2* (del inglés *B-cell lymphoma 2*) que se encuentra relacionado con la apoptosis, así como del gen codificante de la protocadherina 1 (*PCDH1*) y de integrina beta 4 (*ITGB4*), ambos relacionados con el reconocimiento e interacción célula-célula, en los pacientes donde la inseminación no fue exitosa (97). El mismo grupo reportó también las diferencias entre los perfiles de transcripción de grupos de pacientes que realizaron una inyección intracitoplasmática (ICSI), encontrándose 50 transcritos diferencialmente expresados en el semen fresco de los pacientes que lograron la ICSI exitosa, respecto de los que no, y más de 2000 transcritos expresados exclusivamente en uno de estos dos grupos. Para el caso del semen congelado, no se encontraron genes diferencialmente des-regulados entre los dos grupos, pero se encontraron cientos de genes exclusivos para uno de los dos grupos. Las diferencias observadas en todos los casos se atribuyen al fallo en la ICSI, ya que se encontraron diferencias en los transcriptomas de los espermatozoides de pacientes que lograron una ICSI exitosa cuando comparados con los que no lo lograron (98).

En años recientes, los estudios de expresión del ARN empleando NGS han ganado relevancia. Así, el estudio del transcriptoma de espermatozoides de 96 parejas diagnosticadas con infertilidad idiopática que realizaron diferentes tratamientos en la clínica, llevó a la identificación de 648 SRE (SRE, del inglés *sperm RNA elements*) que no presentaron variabilidad en 32 de las 35 parejas del estudio que lograron un embarazo con nacimiento vivo por coito programado (CP)/inseminación intrauterina (IIU). Las parejas que presentaron estos 648 SER presentaron una mayor tasa de éxito mediante CP/IIU (73%) que aquellas que tuvieron falta de alguno de estos SREs (27%). Además, 40% de los SRE identificados fueron encontrados en regiones exónicas de genes involucrados en espermatogénesis, motilidad espermática, fecundación y en los primeros estadios de la embriogénesis previo a la implantación. Y 8 de estos SRE se relacionaron con problemas de infertilidad, por lo cual los pacientes con falla de estos no lograrían un embarazo con CP/IIU, pero sí podrían tener éxito con TRMA. Por otra parte, algunos SRE ausentes en pacientes que no lograron un embarazo exitoso por reproducción asistida, podrían estar relacionados con la fecundación o embriogénesis temprana, por lo que estas técnicas no serían viables para conseguir el embarazo. De esta manera, los autores sugieren que la implementación de SRE en la clínica permitiría evitar los 2 a 4 ciclos que suelen hacerse de IIU antes de derivar a otros procedimientos en parejas que tienen bajas posibilidades de embarazo por falta de SRE, así como ayudar a la toma de decisiones de las parejas donde los SRE sugieren una baja chance de embarazo aún con procedimientos de reproducción asistida, evitando así exponer a la mujer a procedimientos invasivos con poca probabilidad de resultados exitosos (99). Estudios posteriores expandieron los anteriores y reportaron un conjunto de genes relacionados a la infertilidad idiopática: *ACE*, *GIGYF2* y *ODF2* presentaron correlaciones negativas, mientras que *GPX4*, *NDRG1* y *RPS24* tenían SRE ausentes en al menos un individuo de la cohorte de prueba. Asimismo, *GPX4* y *RPS24* fueron asociados con defectos de desarrollo y/o letalidad neonatal (100).

Como se mencionó previamente, además de los ARNm, una gran parte del transcriptoma está compuesto por ARN que no codifica para proteínas, conocidos como ncRNA. Estos ARN están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos, y los relacionados a la biología reproductiva no escapan a su regulación (101). Entre ellos se incluye su rol en la diferenciación/ desarrollo de los testículos (102) y la espermatogénesis (103). Los ncRNA largos (lncRNA, del inglés *long non coding RNA*), de más de 200 pb, están involucrados en muchos mecanismos, como la regulación transcripcional, postranscripcional y directa de la actividad proteica (104). Los sncRNA, de menos de 200 pb, entre ellos los micro ARN (miRNA), los ARN pequeños de interferencia (siRNA) y los *Piwi-interacting RNA* (piRNA), en su mayoría regulan la expresión génica a nivel transcripcional y/o postranscripcional (105,106).

Los ncRNA presentes en el semen podría evidenciar desregulaciones en la espermatogénesis, con el consecuente impacto en la calidad del semen y los trastornos de la fertilidad. Algunos estudios, de hecho, sugieren el potencial de los ncRNA como biomarcadores de enfermedades reproductivas o para el éxito de la reproducción (107). Un estudio de Cui y colaboradores (108) analizó un conjunto de miRNA espermáticos y demostró que el hsa-miR-34c-5p es el único ncRNA en semen que muestra un valor predictivo robusto para infertilidad idiopática masculina en hombres tratados con TRMA, asociándose en los resultados del tratamiento ICSI con calidad embrionaria, implantación, embarazo clínico, y nacido vivo. Por otro lado, Abu-Halima et al.

(109) usaron qRT-PCR para validar en una cohorte de 226 hombres en tratamiento por infertilidad un conjunto de 5 microRNAs (hsamiR-34b-5p, 34b-3p, 34c-5p, 122-5p y 429), e informaron que estos miARN muestran un buen valor de diagnóstico de oligozoospermia. Por su parte, Wang y colaboradores reportaron la potencia diagnóstica de hsa-miR-122-5p, 146-5p, 181a-5p, 34c-5p, 374b-5p, 509-5p y 513a-5p para azoospermia (110), el panel de 3-miARN hsa-miR-141, 429 y 7-1-3p para NOA (111), hsa-miR-122-5p, 146-5p, 181a-5p, 34c-5p, 374b-5p, 509-5p y 513a-5p para astenozoospermia (110) y hsa-miR-210-3p para diszoospermia inducida por varicocele (112).

Otras investigaciones analizaron el potencial de diagnóstico de los piRNA para la azoospermia y la astenozoospermia. En particular, el estudio de Hong y colaboradores (113) empleó tecnología de secuenciación de alto rendimiento en una cohorte de 302 hombres, e identificó un panel de 61 piRNA expresados diferencialmente entre donantes normozoospermicos y pacientes infértiles. Después de validación por qRT-PCR, demostraron la regulación hacia menores niveles de 5 piRNA individuales (piR-30198, 31068, 31925, 43771 y 43773) en plasma seminal de pacientes con azoospermia y astenozoospermia, en comparación con los hombres normozoospermicos. Los mismos investigadores también probaron el potencial de diagnóstico de estos piRNAs combinados en un panel de 5 piRNAs (piR-31068, 31925, 43771, 43773, y 30198) y otro de 4 piRNAs (piR-31068, 31925, 43771 y 43773), y encontraron un mayor valor diagnóstico para azoospermia en el panel de 5 piRNAs. Es más, estos investigadores informaron que piR-30198 puede discriminar entre pacientes con astenozoospermia y azoospermia, mientras que Barceló y colaboradores (114) reportaron al piR-58527 como un biomarcador útil para diferenciar NOA de OA. La aplicación potencial de estos ARN no codificantes como biomarcadores de semen no invasivos podrían minimizar o evitar la toma de muestras quirúrgicas para el diagnóstico y tratamiento, sin embargo, deben ser validados por otros grupos antes de su uso clínico.

## Proteómica

La proteómica es la disciplina de los estudios globales que estudia los proteomas, o conjuntos de proteínas de tejidos, células y fluidos, para determinar su composición, su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), y en ciertos casos sus modificaciones postraduccionales, su localización de forma cualitativa y cuantitativa (115). Si bien la mayoría de los protocolos de análisis empleando microarreglos de ADN o NGS utilizados para abordar estudios de transcriptómica involucran la selección de los ARNm poliadenilados por medio de oligo-dTs, debe tenerse en cuenta que no es correcto asumir que la abundancia de los ARNm se corresponde bien con la de las proteínas, ya que el destino de los ARNm se encuentra regulado por modificaciones, procesamientos, almacenamientos, entre otros. Por lo tanto, si se extrapolaran los cambios de la expresión génica a los de la expresión proteica, podría interpretarse incorrectamente el impacto funcional de estos datos (116). Es por ello que, a pesar de conocer los perfiles de transcriptómica de las personas sanas y pacientes afectados con diversas enfermedades, se ha demostrado que el estudio de los perfiles de proteómica aporta información valiosa y distintiva. En particular, la transcripción y la traducción en el testículo no se encuentran acopladas, por lo que estos dos procesos no están necesariamente relacionados. Por su parte, el espermatozoide es una célula altamente compleja pero de fácil accesibilidad, por lo que los estudios de proteómica pueden hacerse a fin de caracterizar la composición proteica de la gameta masculina y sus alteraciones en asociación con diversas patologías (117). Según el trabajo de Assidi y colaboradores (118), la proteómica de los espermatozoides maduros generalmente revela dos tipos de proteínas: (a) las proteínas de origen extracelular, principalmente de glándulas sexuales accesorias, adsorbida en la superficie de la gameta, entre ellas seminogelina-1 y antígeno prostático específico (PSA), y (b) las proteínas celulares divididas en fracciones solubles e insolubles en detergente. La fracción soluble en detergente comprende proteínas en el citoplasma, moléculas de señalización y receptores de membrana, mientras que la fracción insoluble en detergente comprende principalmente proteínas del citoesqueleto y de asociación a cromatina nuclear. Hasta un 11% de las proteínas espermáticas participan en la defensa celular contra el estrés oxidativo y la apoptosis.

El análisis de proteómica se ha aplicado al estudio de pacientes con alteraciones en el semen. En estudios realizados en muestras de semen de pacientes con astenozoospermia se identificó una expresión diferencial de proteínas; en el estudio de Wang y col (119) se identificaron 45 proteínas sobreexpresadas y 56 infraexpresadas en comparación con el control, identificándose entre las infraexpresadas a PARK7 (anteriormente DJ-1). En otro estudio sobre pacientes con astenozoospermia, se identificaron 66 fosfoproteínas diferencialmente reguladas. Las proteínas más desreguladas pertenecieron principalmente a las HSPs (del inglés *heat shock protein*, o

proteínas de choque térmico), proteínas del citoesqueleto, de la vaina fibrosa y del metabolismo energético. Además, por microscopía electrónica se observaron defectos en las mitocondrias y vainas fibrosas de los espermatozoides, que los autores sugieren que podrían estar relacionados con las alteraciones observadas en el proteoma. Más aún, el análisis de las vías de señalización reveló que el metabolismo energético de carbohidratos, la señalización de AMPc mediada por PKA, la señalización de PI3K/AKT y la vía de señalización regulada por actina basada en la motilidad por Rho estuvieron significativamente alteradas, indicando que la motilidad espermática estaría regulada por estas vías. De esta manera, con el uso de tecnologías de proteómica, los autores identificaron moléculas de firma o "*signature*" de la astenozoospermia (120). Otro estudio comparó los perfiles proteómicos de las colas de espermatozoides de 35 pacientes astenozoospermicos y 33 normozoospermicos con el uso de cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas (LC-MS/MS). Como resultado, se identificaron 14 proteínas con abundancia alterada al compararlas con las de los controles. De estas, 10 ya habían sido previamente relacionadas con la astenozoospermia (GAPDS, COX6B, ODF2, AKAP4, PHGPx, CLU, GST Mu3, KRT1, VDAC2 y HSPA2), pero las 4 proteínas restantes (HSPA9, TUBB2B, SPANX B y ASRGL1) se asociaron con esta condición por primera vez en este estudio (121).

Teniendo en cuenta el impacto que tiene la obesidad sobre la calidad seminal, en otro estudio se compararon los perfiles de proteómica de 3 pacientes con astenozoospermia y obesidad y 3 pacientes fértiles empleando LC-MS/MS. Se cuantificaron en total 1975 proteínas de las cuales 127 presentaron cambios en su abundancia estadísticamente significativos (105 disminuidas y 22 aumentadas en los pacientes con obesidad). Las proteínas con baja abundancia en la astenozoospermia asociada a obesidad se pueden separar en diferentes grupos (proteínas del citoesqueleto, proteínas vesiculares, proteínas del proteasoma) todas ellas relacionadas con la espermatogénesis cuyos cambios podrían causar un funcionamiento anormal del espermatozoide. Dentro de las proteínas con abundancia afectada se encontró a ERp57, una proteína multifunción bien caracterizada cuya función principal es mediar el correcto plegamiento y control de calidad de glicoproteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático. Por otra parte, se encontró disminuida a la proteína ACTRT2 en el grupo en estudio, proteína del citoesqueleto se localiza en la región post-acrosomal y en la pieza media, por lo que su deficiencia podría causar anomalías en el citoesqueleto, especialmente en la pieza media donde se encuentra la vaina mitocondrial que provee de energía para la motilidad espermática (122).

Otros estudios han identificado varias proteínas que se correlacionan con la integridad del ADN del espermatozoide y pueden servir como marcadores para discriminar OA de NOA (123,124).

Dado que el varicocele es la causa más común de infertilidad masculina, resulta de interés caracterizar, a través de estudios de proteómica, las alteraciones en los perfiles proteicos de pacientes con esta patología. En el estudio de Hossenif y colaboradores (125), se compararon los perfiles proteómicos de 20 pacientes oligozoospermicos con varicocele con los de 20 donantes control normozoospermicos empleando la electroforesis en gel de dos dimensiones. Como resultado, se encontraron 15 "*spots*" con diferencias consistentes entre los grupos estudiados. En el grupo de individuos con varicocele, uno fue exclusivo de este grupo, 12 presentaron su abundancia disminuida y 2 aumentada. Los 15 "*spots*" correspondieron a 10 proteínas de "*shock*" térmico, mitocondriales y del citoesqueleto (ACPP, CLU, PARK7, KLK3, PIP, SOD1, SEMG2, SEMG2re, ATP5D, HSPA5). Más adelante, el mismo grupo demostró que en 20 pacientes a los que se les realizó una varicocelectomía, las abundancias de 3 de las proteínas identificadas (HSPA5, SOD1, ATP5D) relacionadas con producción espermática, protección de la integridad del ADN y motilidad espermática, difirió antes y luego de la cirugía, siendo estas comparables con las de pacientes control sanos luego de la cirugía (126). En un estudio posterior, Agarwal y colaboradores (127) compararon los perfiles proteicos de muestras de espermatozoides de 5 hombres infértiles con varicocele unilateral con los de 5 hombres fértiles control. Como resultado, se identificaron 369 proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos. De estas, 29 se identificaron como proteínas de interés por su rol en espermatogénesis y otros eventos reproductivos fundamentales como la maduración espermática, la adquisición de motilidad, la hiperactivación, la capacitación, la reacción acrosomal y la fecundación. Las anotaciones funcionales de este estudio mostraron evidencias de que el varicocele unilateral afecta principalmente a la bioquímica de pequeñas moléculas y a las modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

En relación a los cambios en la expresión de proteínas y el varicocele en adolescentes, un estudio reportó los resultados de proteómica empleando electroforesis en dos dimensiones y

espectrometría de masas del plasma seminal de tres grupos de adolescentes de entre 10 y 19 años en un estadio de Tanner V, distribuidos en 3 grupos: 21 adolescentes sin varicocele y parámetros seminales normales (control), 28 adolescentes con varicocele grado II o III con parámetros seminales normales (VNS) y 18 adolescentes con varicocele y parámetros seminales anormales (VAS). Como resultado, del total de “spots” identificados en la electroforesis, 47 fueron caracterizados, identificándose proteínas relacionadas con la espermatogénesis, la motilidad y la capacitación, la inmunidad, la apoptosis, el transporte de moléculas, y la inflamación. En particular, se identificaron en el grupo VAS a las proteínas IBP-3 y SMG1 exclusivamente expresadas, que se relacionan con la regulación de la apoptosis, en los VNS a BRE1B y E3-beta, que mantienen la espermatogénesis y función espermática durante hipertermia e hipoxia tisular y en el grupo control a NPC2, IDH y la proteína linfoide restringida a membrana, cuya presencia podría asociarse con la homeostasis y el mantenimiento de la función espermática en un ambiente inocuo. De esta manera, se identificaron proteínas reguladoras de la apoptosis sobreexpresadas en los pacientes con varicocele y semen anormal, mientras que las proteínas relacionadas con espermatogénesis se vieron sobreexpresadas en el grupo con varicocele y parámetros seminales normales respecto del control que expresó proteínas relacionadas a la homeostasis. Por este motivo, los autores proponen la utilización de algunas de las proteínas identificadas para un diagnóstico más temprano del varicocele, incluso ante ausencia de cambios en el análisis seminal (128).

También se ha utilizado la proteómica para evaluar las diferencias de perfiles entre hombres que logran el embarazo o no, luego de TRMA. Se ha presentado un caso de estudio donde se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos con electroforesis en dos dimensiones de un paciente que falló en el tratamiento de FIV y 3 pacientes fértiles control, estudio en el que se identificaron proteínas correspondientes a 20 “spots” diferenciales entre el paciente y los controles (6 faltantes, 3 adicionales, 4 menos abundantes y 7 más abundantes). Dentro de las proteínas identificadas, se destacó a la proteína secretora de unión a actina cuyo incremento podría causar una mayor interacción con las células T, una interacción con proteínas claves del citoesqueleto o afectar a la unión con la *Zona Pellucida* produciendo fallas en la fertilidad. Otra proteína alterada fue la proteína de la fibra densa externa 2 (ODF2) que se localiza en las estructuras del citoesqueleto de la cola rodeando el axonema en la pieza media y principal del flagelo; la alteración en esta proteína podría resultar en espermatozoides morfológicamente anormales (129). Unos años más tarde, se compararon los perfiles proteómicos de 3 pacientes normozoospermicos según los criterios de la OMS o pacientes con parámetros espermáticos anormales pero compatibles con FIV que fracasaron en el primer ciclo de esta técnica (es decir, que no tuvieron unión de espermatozoides a la *Zona Pellucida* o hubo deficiencia en la misma), y 3 pacientes control con espermatozoides normales que lograron fecundar previamente al ovocito durante una FIV que se recomendó debido a factores tubáricos en la mujer. Se observaron 14 proteínas diferencialmente expresadas entre el grupo en estudio y el control, de las cuales 12 fueron identificadas por espectrometría de masas. Entre ellas, se identificó a la proteína ribosomal p40 involucrada en la adhesión celular, así como la L-xilulosa reductasa o p34H que ya se había demostrado que se presenta en tasas anormalmente bajas en pacientes que fallan en la FIV. De esta manera, a pesar de que los pacientes del estudio pudieron superar los problemas presentados en la FIV realizando ICSI, se lograron identificar proteínas que podrían comprometer el éxito de la FIV y pueden asociarse a fallos en esta técnica (130). Más recientemente, por medio de espectrometría de masas con marcación en *tandem* se obtuvieron los perfiles proteómicos de 6 donantes involucrados en TRMA (ya sea FIV o inseminación artificial, IA) resultando en 5 embarazos clínicos en menos de 8 ciclos de FIV o IA, y 6 donantes cuyos espermatozoides no lograron un embarazo clínico en más de 15 ciclos de FIV y IA. Se identificaron 21 proteínas diferencialmente expresadas en los donantes que no alcanzaron un embarazo clínico respecto de los que sí, y de éstas, 5 fueron validadas (A2LD1, CRISP2, ATP1B3, PGRMC1 y FBXO2). Las proteínas A2LD1, ATP1B3 y FBXO2 mostraron el mismo patrón diferencial observado en el análisis de espectrometría de masas mientras que la discordancia observada para CRISP2 y PGRMC1 sugiere que otros homólogos de las familias de estas proteínas podrían estar teniendo un rol importante (131). En otros estudios, la clusterina, la proteína secretora E1 del epidídimo y el PSA se han propuestos como biomarcadores seminales para el éxito de la FIV en parejas infértiles (132) y se correlacionó con la calidad, la motilidad y la viabilidad espermática (133).

Un estudio reciente recopiló un total de 17 estudios de proteómica que reportaron un total de 32 biomarcadores de proteínas del semen para predecir diferentes parámetros la calidad espermática, así como su funcionalidad y/o su capacidad fecundante, algunos de los que resultan de estudios de proteómica (134). Algunos candidatos a biomarcadores mostraron un alto valor de diagnóstico para trastornos como azoospermia, astenozoospermia y oligozoospermia, así como

por alteraciones de la fisiología espermática, tales como la actividad mitocondrial, la estabilidad del acrosoma y el ADN integridad, siendo así prometedoros biomarcadores candidatos para la clínica diagnóstica de trastornos de la reproducción masculina. En particular, el trabajo reseña el estudio de Intasqui y col. (135), que realizó un análisis proteómico utilizando una cohorte de 156 hombres normozoospermicos y reveló algunas proteínas del plasma seminal capaces de identificar espermatozoides de baja actividad mitocondrial (proteómica perfil de Anexina A7 y CD63; AUC=0,993), integridad del acrosoma alterado (perfil proteómico de PLTP y COL12A1; AUC=0,972) y alta fragmentación del ADN (CRISPLD1; AUC=0,882). Otras proteínas espermáticas y de plasma seminal identificadas pueden predecir el potencial fértil del eyaculado. Así, la concentración espermática de BAG6 y HIST1H2BA (136), fue capaz de discriminar entre hombres fértiles y subfétil/infértiles que muestran un análisis de semen anormal, con AUC de 0,921 y 0,935 respectivamente.

Los trabajos mencionados resaltan la utilidad de la proteómica como herramienta no sólo para la identificación de nuevos biomarcadores, sino también para la mejor comprensión a nivel molecular de la infertilidad. Más aún, el conocimiento de las diferencias entre los perfiles proteómicos de pacientes permitiría, en un futuro, podrá brindar un mejor diagnóstico de la infertilidad y elegir TRMA que tengan una mayor probabilidad de éxito según cada paciente, contribuyendo así a la medicina personalizada.

### **Metabolómica y otras ómicas**

La metabolómica se define como el estudio de las células, tejidos o fluidos biológicos a través de sus metabolitos, siendo estos el producto final de los procesos celulares. De esta manera, la secuencia de metabolitos creados por una organización biológica comprende el metaboloma de la misma (137). Se considera que los metabolitos se encuentran en la última etapa de la jerarquía metabólica de la célula, y son los productos finales de la actividad celular, de los procesos reguladores y de los sistemas biológicos siguiendo cambios ambientales y genéticos, se encuentran más cercanos a replicar el estado fenotípico exacto de la célula que el transcriptoma y el proteoma (138).

Al igual que en otros sistemas, hay publicaciones que revelan que la metabolómica puede aplicarse al estudio de la salud reproductiva en el hombre. Uno de los primeros estudios que se realizaron en el plasma seminal utilizó la resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>1</sup>H para analizar la metabolómica de 14 pacientes con OA (vasectomizados) y 7 con oligoastenozoospermia severa y comparar los resultados con los correspondientes a 18 donantes normozoospermicos (control). Como resultado de la medición del área de los picos de los espectros de diferentes metabolitos, se observó que los correspondientes a glicerilfosforilcolina (GPC), citrato y lactato eran mayores en pacientes normozoospermicos cuando comparados con los de los pacientes azoospermicos o con oligoastenozoospermia. Además, se determinaron diferencias significativas entre los cocientes de los picos citrato:lactato y GPC:lactato en los tres grupos respecto del control, pero no en el cociente GPC:citrato. También se encontraron diferencias significativas en el cociente GPE:GPC (siendo GPE la gliceril fosforiletanolamina) entre hombres con fallas en la espermatogénesis y aquellos que presentaron azoospermia (vasectomizados). De esta manera los autores sugirieron que la combinación de métodos bioquímicos y de resonancia magnética nuclear en el plasma seminal podrían aportar a la determinación de las bases moleculares de patologías (139).

Años más tarde, se utilizó también la RMN para analizar los metabolitos del plasma seminal de 103 pacientes: 6 control, 17 con infertilidad idiopática, 20 con oligozoospermia, 20 con astenozoospermia, 20 con teratozoospermia y 20 con azoospermia. Como resultado del estudio, se encontraron diferencias entre los perfiles de los pacientes infértiles respecto del grupo control, destacándose en el estudio las diferencias entre los pacientes con infertilidad idiopática, resultados que revelan el impacto metabólico asociado a la infertilidad idiopática (140).

En otro estudio, se analizaron por RMN los perfiles metabolómicos del plasma seminal de 33 pacientes astenozoospermicos, y los resultados se compararon con los de 30 controles sanos, encontrándose 19 metabolitos alterados en los casos patológicos. Entre ellos, se observó un aumento o disminución de varios aminoácidos, cambios en el metabolismo de lípidos, de fosfolípidos (en particular, la colina), del colesterol, de los nucleósidos, de la energía y del ciclo de

Krebs en los pacientes con astenozoospermia. Según los autores, este análisis permitió describir las características metabólicas de la astenozoospermia desde un punto de vista integral, poniendo en evidencia las limitaciones de los análisis seminales de rutinas y destacando la importancia de la metabolómica para un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos y eventualmente un mejor diagnóstico y tratamiento de la astenozoospermia (141).

También se ha utilizado otro enfoque para el estudio de la metabolómica de pacientes con astenozoospermia. Específicamente, se utilizó la espectroscopía de Raman, que se caracteriza por su bajo costo, así como por ser una metodología rápida y precisa sin ser sensible al agua como otras alternativas tales como la espectroscopia de infrarrojo cercano. Más aún, esta técnica permite una fácil preparación de las muestras y análisis del plasma seminal. Como resultado del análisis de los perfiles metabólicos de 13 pacientes normozoospermicos y 13 astenozoospermicos, se encontró 83% de predicciones correctas, por lo que esta tecnología puede identificar cambios significativos en el metaboloma del plasma seminal de pacientes astenozoospermicos respecto de los normozoospermicos (142). Además, el mismo grupo utilizó más adelante esta tecnología para evaluar el perfil metabólico del plasma seminal y predecir la espermatogénesis en pacientes con NOA a ser tratados con TRMA (143). El estudio comparó un grupo de 10 pacientes, de los cuales se logró una extracción de espermatozoides testiculares (TESE) positiva, 10 que fueron TESE negativos y un grupo de 15 donantes control. Como resultado del análisis, se lograron distinguir los pacientes TESE negativos de los positivos, presentando estos últimos una superposición con los perfiles del grupo control fértil.

Asimismo, posteriormente un estudio reveló niveles reducidos de metabolitos en plasma seminal, incluidos aminoácidos, lactato, citrato, creatinina, ácido alfa-cetoglutarico, espermina y putrescina, alteraciones que permitieron distinguir pacientes con oligoastenoteratozoospermia de controles normozoospermicos (144). Y en otro estudio, se identificaron 63 metabolitos, los que podrían constituirse en biomarcadores potenciales de la infertilidad masculina, pues 17 fueron correlacionados con los parámetros seminales (145).

En un estudio reciente, se analizó el perfil metabólico en pacientes añosos conjuntamente con los parámetros de rutina del semen y el índice de fragmentación del ADN. Como resultado, los autores identificaron que la edad masculina se correlacionó positivamente con concentración espermática, así como el índice de fragmentación de ADN, y negativamente con conteo progresivo de espermatozoides móviles, conteo total de espermatozoides, volumen de espermatozoides y motilidad progresiva de los espermatozoides. Los metabolitos diferenciales fueron significativamente enriquecidos en varias vías metabólicas, y cuatro de estos metabolitos diferenciales (pipamperona, 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrotrietanol, Arg-Pro y fosfato de trietilo) se utilizaron para establecer un panel de biomarcadores para identificar el envejecimiento del semen (146).

La metabolómica también se ha aplicado en el estudio del varicocele, donde se buscaron potenciales biomarcadores metabólicos para distinguir pacientes infértiles con varicocele de los pacientes fértiles sin varicocele. Para ello se estudió el perfil metabólico de un grupo de 35 hombres con varicocele y 24 donantes control por RMN en el plasma seminal. Al segregar los grupos se identificaron 19 metabolitos: caprato, 2-hidroxi-3-metilvalerato, leucina, valina, 3-hidroxibuirato, lactato, alanina, 4-aminobutirato, isoleucina, citrato, metanol, glucosa, glicósidos, glicerol-3-fosfocolina, n-acetil tirosina, glutamina, tirosina, arginina y uridina. De estos metabolitos, la mayoría se encuentran involucrados en el estrés oxidativo causado por el varicocele y su respuesta, por lo que se resalta la importancia de estos mecanismos en la patogénesis del varicocele (147).

Finalmente, es posible estudiar la fertilidad masculina no solo a través del metaboloma del plasma seminal, sino que también puede tenerse en cuenta el metaboloma urinario. Al comparar los perfiles obtenidos por cromatografía líquida y espectrometría de masas de 158 donantes fértiles y 135 pacientes oligozoospermicos infértiles, se identificaron 10 marcadores potenciales para la oligozoospermia. Entre ellos se observó la acilcarnitina, el ácido aspártico y la leucilprolina disminuidas, así como la adenina y metilxantina aumentadas (148). Otra alternativa, es el estudio del metaboloma sanguíneo, ya que se han comparado los perfiles obtenidos por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa de 70 pacientes infértiles, de los cuales 26 presentaron disfunción eréctil y 44 anomalías seminales (oligozoospermia) y 61 pacientes control a fin de identificar potenciales marcadores. Entre ellos, el 1,5 anhidrosorbitol y el ácido  $\alpha$ -hidroxi isovalérico permitirían distinguir a los pacientes sanos de los infértiles, mientras que el lactato, glutamato y colesterol a aquellos con disfunción eréctil de los que presentan anomalías en el semen (149).



Además de la metabolómica, debe destacarse el aporte de otros estudios globales, como la glicómica (estudio integral de azúcares libres o presentes en moléculas más complejas de un organismo), y la lipidómica (estudio a gran escala de vías y redes de lípidos celulares en sistemas biológicos), tecnologías de análisis con gran potencial para caracterizar procesos celulares e identificar biomarcadores de diagnóstico. En este sentido, se ha sugerido que el perfil de glicómica del plasma seminal puede estar asociado con el potencial reproductivo masculino (150). Asimismo, se han informado niveles elevados de ácido araquidónico y otros ácidos grasos en espermatozoides de pacientes con astenozoospermia (151). Para evaluar la relación entre los lípidos y el impacto en los resultados de ICSI, se analizaron los perfiles lipídicos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de muestras de espermatozoides utilizadas en ciclos de ICSI que dieron lugar a un embarazo con aquellas que no lo condujeron. Como resultado, se detectaron 151 lípidos diferentes en las muestras, 10 de los cuales aumentaron significativamente en las muestras del grupo que no dio embarazado, con un cambio de 1,10 a 1,30 veces. Estos lípidos fueron principalmente ceramidas, esfingomielinas y glicerofosfolípidos, una lisofosfatidilcolina y dos especies de plasmalógenos. Además, también se encontraron niveles más altos de 2-monoacilglicerofosfolina en el grupo de las fallas de embarazo (152). Dado que los lípidos componen la mayor parte de la membrana plasmática de los espermatozoides, los estudios son de gran interés y abren las puertas a una caracterización de la composición lipídica del espermatozoide normal y a la identificación de nuevos biomarcadores.

## Multiómicas

Mientras que las ómicas simples pueden reflejar principalmente un aspecto del sistema biológico, las multiómicas permiten la comprensión sistemática del flujo de información a través de diferentes capas ómicas. Los análisis multiómicos que aprovechan estas tecnologías de genómica, transcriptómica, epigenómica, proteómica, metabolómica y otras áreas ómicas, se consideran la clave para el avance de la medicina de precisión en la clínica. Las tecnologías ómicas de alto rendimiento permiten la recuperación de información biológica integral y holística, mientras que las capacidades computacionales permiten el modelado de datos de alta dimensión. Además, la bioinformática ha permitido la integración integral de datos clínicos y multiómicos para una interpretación perspicaz. El avance de las tecnologías de secuenciación global y de una sola célula, así como los métodos computacionales relacionados para la multiómica, han facilitado el desarrollo de la biología de sistemas y la medicina de precisión en numerosos órganos y en diversas patologías. Este abordaje innovador de la medicina tiene como objetivo proporcionar un diagnóstico y tratamiento eficaz e individualizado a través de un enfoque integral basado en datos obtenidos a partir de técnicas ómicas así como otros estudios de imágenes e historia clínica del paciente.

Los avances recientes en las tecnologías multiómicas han dado lugar a esfuerzos sin precedentes, al caracterizar cambios moleculares que subyacen en el desarrollo y la progresión de una amplia gama de enfermedades humanas complejas, incluyendo el cáncer, las infecciones y las enfermedades relacionadas con la edad (153). Específicamente, en lo que concierne a la salud reproductiva masculina, los avances en la secuenciación completa del genoma y amplificación del transcriptoma completo han acelerado la secuenciación de cantidades diminutas de ADN y ARN de una sola célula y han proporcionado un alcance más representativo de la naturaleza de heterogeneidad genómica y transcriptómica que ocurre tanto en pacientes normales como enfermos (154,155).

La identificación de biomarcadores moleculares fiables en el semen podría ayudar en el diagnóstico y tratamiento de afecciones causando trastornos en la calidad del semen y la fertilidad masculina. En este sentido, explorando biomarcadores de semen que muestran alto diagnóstico valor es de gran interés para determinar su potencial para convertirse en herramientas clínicas para el diagnóstico de disfunciones en la calidad del esperma y predecir la fertilidad masculina y el éxito de ART. La combinación de biomarcadores independientes para llegar a una biología de sistemas en el campo de la andrología está actualmente en su infancia.

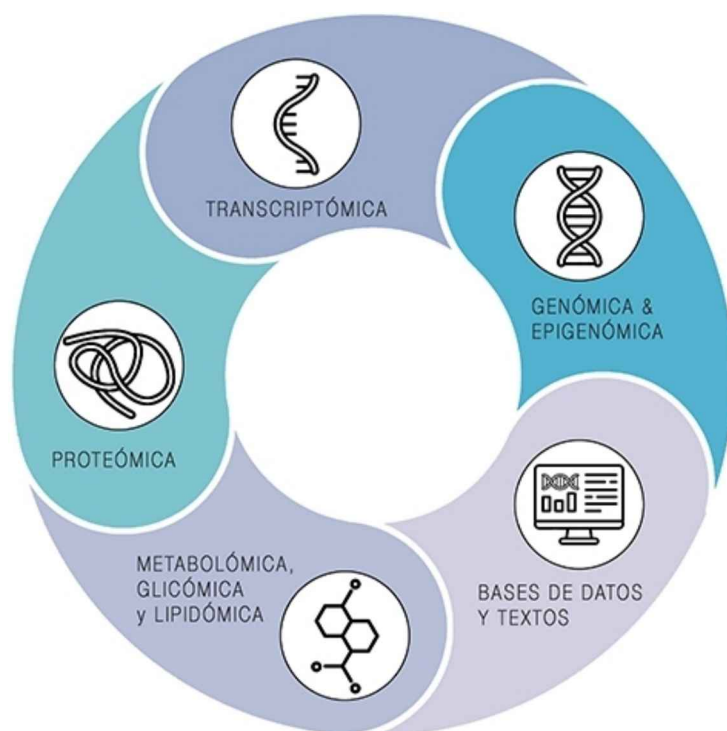
Abordar la compleja etiología de la infertilidad masculina requiere un enfoque integral que combine todos los aspectos relevantes para lograr medicina de precisión para la infertilidad masculina, que incluya el análisis seminal, la cirugía robótica, la terapia celular, las TRMA, las tecnologías de análisis multiómico presentadas en este capítulo, y las pruebas/imágenes de células individuales. Además del valor agregado de las tecnologías de "big data" y visualización digital, se necesita enfatizar que la teranóstica de la infertilidad masculina también debe integrar el

análisis del estilo de vida individual, y los factores ambientales como determinantes clave que complementan los esfuerzos clínicos. Los factores ambientales pueden afectar los perfiles hormonales, la diferenciación de las células testiculares, la maduración de los espermatozoides, y transporte en el epidídimo. Los hábitos alimentarios también determinan la composición de la microbiota intestinal, que ofrece opciones preventivas y terapéuticas directas e indirectas adicionales, aunque el papel de la microbiota, tanto intestinal como urinaria y genital aún debe ser caracterizado.

Hasta el momento, se han publicado numerosos estudios enfocados a la comprensión de la infertilidad masculina donde se implementan las diferentes ómicas de manera individual. Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de dos ómicas diferentes, pero biológicamente relacionadas entre sí, es un abordaje integral para estudiar la infertilidad masculina multifactorial (156). Este tipo de enfoques integrativos tienen un gran potencial para el entendimiento de las bases moleculares asociadas a la fertilidad, ya que las condiciones clínicas y fisiológicas de una célula son el resultado de la interacción entre diferentes componentes individuales del sistema biológico que pueden verse reflejados en las diferentes ómicas. Por otra parte, una única anotación no refleja de forma precisa la función de un gen y más aún, se puede obtener información a partir de falsos positivos, por estos motivos la investigación a partir de datos obtenidos por ómicas independientes no descifra de manera fiable la información como lo hacen las diferencias moleculares que se encuentran al estudiar múltiples módulos de ómicas.

El enfoque ómico integrado se ha utilizado para definir la microtubuloma de espermatozoide humano, combinando proteómica, transcriptómica e interactómica y los resultados de este análisis sugieren que CUL3 y DCDC2C juegan un papel en el funcionamiento del flagelo del espermatozoide (157). Las tecnologías multiómicas también se están aplicando en modelos animales. En este contexto, Talluri et al (158) realizaron un extenso estudio multiómico integrado sobre la fertilidad del toro, identificando la desregulación de 4 766 ARNm, 785 proteínas y 33 metabolitos entre toros de alta y baja fertilidad.

Actualmente existen relativamente pocos estudios integrados ómicos sobre la infertilidad masculina, a pesar de sus prometedoras aplicaciones. Un enfoque multiómico para comprender los fenotipos de infertilidad puede generar una visión más holística de la enfermedad y contribuir al desarrollo de mejores métodos de detección y opciones de tratamiento. Por lo tanto, además de descubrir causas genéticas de infertilidad aún desconocidas, la integración de múltiples campos de estudio podría generar contribuciones valiosas para comprender el desarrollo de la enfermedad. Estudios futuros multiómicos permitirán integrar información fragmentada y facilitar el descubrimiento de biomarcadores y tratamientos en la infertilidad masculina.



**Figura.** Esquema representativo que integra las tecnologías globales de genómica y epigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, glicómica y lipidómica, junto con los abordajes bioinformáticos sobre bases de datos y textos aplicadas al estudio de la Salud Reproductiva Masculina, reseñadas en este capítulo.

## Referencias

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
2. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* (2002) 360:151-9.
3. Centola GM. Semen assessment. *Urol Clin North Am* (2014) 41:163-7.
4. Chu KY, Patel P, Ramasamy R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol* (2019) 29:267-71.
5. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part I. *Fertil Steril.* (2021) 115:54-61.
6. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JI, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II. *Fertil Steril* (2021) 115:62-69.
7. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5ta edición. Cambridge, UK. Cambridge University Press (2010).

8. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org). Management of nonobstructive azoospermia: a committee opinion. *Fertil Steril*. (2018) 110: 1239-1245.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org). The management of obstructive azoospermia: a committee opinion. *Fertil Steril*. (2019) 111:873-880.
10. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. *Fertil Steril*. (1983) 39:5-21.
11. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Hum Androl* (2011) 1:2-16.
12. World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed. World Health Organization.
13. Nam CS, Mehta A. Advanced sperm tests and impact on clinical male factor management. *Curr Opin Urol*. (2023) 33:24-30.
14. NIH. A Brief Guide to Genomics. In National Human Genome Research Institute. 2021. Available online: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/A-Brief-Guide-to-Genomics> (accessed on 19 July 2021).
15. Melé M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, Young TR, Goldmann JM, Pervouchine DD, Sullivan TJ, Johnson R, Segrè AV, Djebali S, Niarchou A; GTEx Consortium; Wright FA, Lappalainen T, Calvo M, Getz G, Dermitzakis ET, Ardlie KG, Guigó R. Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*. 2015 May 8;348(6235):660-5.
16. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. (1999) 17:121-7.
17. [Stratified, personalised or P4 medicine: a new direction for placing the patient at the centre of healthcare and health education](#) (Technical report). Academy of Medical Sciences. May 2015. Archived from the original on 27 October 2016. Retrieved 6 January 2016.
18. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. (2003) 300:286-90.
19. Bauer-Mehren A, Rautschka M, Sanz F, Furlong LI. DisGeNET: a Cytoscape plugin to visualize, integrate, search and analyze gene-disease networks. *Bioinformatics* (2010) 26:2924-2926.
20. Piñero J, Ramírez-Anguita JM, Saüch-Pitarch J, Ronzano F, Centeno E, Sanz F, Furlong LI. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res* (2020) 48:D845-55.
21. Lussier YA, Li H. The rise of translational bioinformatics. *Genome Biol* (2012) 13:319.
22. Shameer K, Badgeley MA, Miotto R, Glicksberg BS, Morgan JW, Dudley JT. Translational bioinformatics in the era of real-time biomedical, health care and wellness data streams. *Brief Bioinform* (2017) 18:105-24.
23. Shen B, Teschendorff AE, Zhi D, Xia J. Biomedical data integration, modeling, and simulation in the era of big data and translational medicine. *Biomed Res Int* (2014) 2014:731546.
24. Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Front Biosci (Schol Ed)*. (2017) 9:375-394.

25. Garrido N, Hervás I. Personalized Medicine in Infertile Men. *Urol Clin North Am* (2020) 47:245-255.
26. Wagner AO, Turk A, Kunej T. Towards a Multi-Omics of Male Infertility. *World J Mens Health*. 2023 Jan 4. doi: 10.5534/wjmh.220186.
27. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. (2018) 15:369-384.
28. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. (2018) 16:14.
29. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Beltramone F, Estofan G, Molina RI, Vazquez-Levin MH. Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics. *Fertil Steril*. (2018) 110:68-75.e4.
30. Verón GL, Tissera AD, Bello R, Estofan GM, Hernández M, Beltramone F, Molina RI, Vazquez-Levin MH. Association between meteorological variables and semen quality: a retrospective study. *Int J Biometeorol*. (2021) 65:1399-1414.
31. Jedidi I, Ouchari M, Yin Q. Autosomal single-gene disorders involved in human infertility. *Saudi J Biol Sci*. (2018) 25:881-7.
32. Witherspoon L, Dergham A, Flannigan R. Y-microdeletions: A review of the genetic basis for this common cause of male infertility. *Transl. Androl. Urol* (2021), 10:1383.
33. Douglas TC. *The genetics of male infertility*. New Jersey: Humana Press; 2007. pp. 99–99.
34. Groth KA, Skakkebaek A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:20-30.
35. Zitzmann M, Aksglaede L, Corona G, Isidori AM, Juul A, T'Sjoen G, Kliesch S, D'Hauwers K, Toppari J, Słowikowska-Hilczer J, Tüttelmann F, Ferlin A. European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology* (2021) 9:145-167.
36. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* (2010) 95:1013-24.
37. Hotaling JM. Genetics of male infertility. *Urol Clin North Am*. (2014) 41:1-17.
38. Romo-Yáñez J, Sevilla-Montoya R, Pérez-González E, Flores-Reyes J, Laresgoiti-Servitje E, Espino-Sosa S, Domínguez-Castro M, Razo-Aguilera G, Hidalgo-Bravo A, Aguinaga-Ríos M. AZFa, AZFb, AZFc and gr/gr Y-chromosome microdeletions in azoospermic and severe oligozoospermic patients, analyzed from a neural network perspective. *Cir Cir* (2022) 90:202-209.
39. Cannarella R, Crafa A, Condorelli RA, Mongioì LM, La Vignera S, Calogero AE. Relevance of sperm imprinted gene methylation on assisted reproductive technique outcomes and pregnancy loss: a systematic review. *Syst Biol Reprod Med* (2021) 67:251-259.
40. Harper JC, Aittomäki K, Borry P, Cornel MC, de Wert G, Dondorp W, Geraedts J, Gianaroli L, Ketterson K, Liebaers I, Lundin K, Mertes H, Morris M, Pennings G, Sermon K, Spits C, Soini S, van Montfoort APA, Veiga A, Vermeesch JR, Viville S, Macek M Jr; on behalf of the European Society of Human Reproduction and Embryology and European Society of Human Genetics. Recent developments in genetics and medically

- assisted reproduction: from research to clinical applications. *Eur J Hum Genet* (2018) 26:12-33.
41. Okutman O, Rhouma MB, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J Assist Reprod Genet* (2018) 35:1939-51.
  42. Guerri G, Maniscalchi T, Barati S, Dhuli K, Busetto GM, Del Giudice F, De Berardinis E, De Antoni L, Miertus J, Bertelli M. Syndromic infertility. *Acta Biomed* (2019) 90(10-S):75-82.
  43. Signore F, Gulia C, Votino R, De Leo V, Zaami S, Putignani L, Gigli S, Santini E, Bertacca L, Porrello A, Piergentili R. The Role of Number of Copies, Structure, Behavior and Copy Number Variations (CNV) of the Y Chromosome in Male Infertility. *Genes (Basel)*. (2019) 11:40.
  44. Vockel M, Riera-Escamilla A, Tüttelmann F, Krausz C. The X chromosome and male infertility. *Hum Genet*. (2021) 140:203-215.
  45. Kikas T, Punab AM, Kasak L, Poolamets O, Vihljajev V, Pomm K, Reiman M, Tjagur S, Korrovits P, Punab M, Laan M. Microdeletions and microduplications linked to severe congenital disorders in infertile men. *Sci Rep*. (2023)13:574.
  46. Ji J, Qin Y, Wang R, Huang Z, Zhang Y, Zhou R, Song L, Ling X, Hu Z, Miao D, Shen H, Xia Y, Wang X, Lu C. Copy number gain of VCX, X-linked multi-copy gene, leads to cell proliferation and apoptosis during spermatogenesis. *Oncotarget*. (2016) 7:78532-78540.
  47. Han LJ, He XF, Ye XH. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and male infertility risk: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. (2020) 99:e23662.
  48. Mostafa T, Abdel-Hamid I, Taymour M, Ali O. Genetic variants in varicocele-related male infertility: a systematic review and future directions. *Hum Fertil (Camb)*. (2021):1-17.
  49. Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu AM, Sharma R, Esteves SC, Aljowair A, Emirzeoglu D, Alkhani A, Pelegrini L, Joumah A, Sabanegh E. Association between promoter methylation of MLH1 and MSH2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men-A pilot study. *Andrologia*. (2018) 50(3).
  50. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: a review of literature. *J Hum Reprod Sci* (2015) 8:191-6.
  51. Malcher A, Stokowy T, Berman A, Olszewska M, Jedrzejczak P, Sielski D, Nowakowski A, Rozwadowska N, Yatsenko AN, Kurpisz MK. Whole-genome sequencing identifies new candidate genes for nonobstructive azoospermia. *Andrology* (2022)10:1605-1624.
  52. Bieth E, Hamdi SM, Mieusset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet*. (2021) 140:59-76.
  53. De Braekeleer M, Nguyen MH, Morel F, Perrin A. Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet*. (2015) 32:615-23.
  54. Ortega V, Oyanedel J, Fleck-Lavergne D, Horta F, Mercado-Campero A, Palma-Ceppi C. Macrozoospermia associated with mutations of AURKC gene: First case report in Latin America and literature review. *Rev Int Androl*. (2020) 18:159-163.
  55. Beurois J, Cazin C, Kherraf ZE, Martinez G, Celse T, Touré A, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. Genetics of teratozoospermia: Back to the head. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. (2020)

56. 34:101473.
57. Tu C, Wang W, Hu T, Lu G, Lin G, Tan YQ. Genetic underpinnings of asthenozoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* (2020) 34:101472.
58. Schubert M, Pérez Lanuza L, Wöste M, Dugas M, Carmona FD, Palomino-Morales RJ, Rassam Y, Heilmann-Heimbach S, Tüttelmann F, Kliesch S, Gromoll J. A GWAS in Idiopathic/Unexplained Infertile Men Detects a Genomic Region Determining Follicle-Stimulating Hormone Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* (2022) 107:2350-2361.
59. Joseph S, Mahale SD. Male Infertility Knowledgebase: decoding the genetic and disease landscape. *Database (Oxford)* (2021) 2021:baab049.
60. Darde TA, Sallou O, Becker E, Evrard B, Monjeaud C, Le Bras Y, Jégou B, Collin O, Rolland AD, Chalmel F. The ReproGenomics Viewer: an integrative cross-species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* (2015) 43(W1):W109-16.
61. *Russell PJ (2010). iGenetics: A Molecular Approach (3rd ed.). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. ISBN 978-0-321-56976-9.*
62. Kazimierczyk M, Wrzesinski J. Long Non-Coding RNA Epigenetics. *Int J Mol Sci.* (2021) 22:6166.
63. Alabert C, Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13:153-67.
64. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* (2010) 28:1057-68.
65. Santi D, De Vincentis S, Magnani E, Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology.* (2017) 5:695-703.
66. Patel DP, Jenkins TG, Aston KI, Guo J, Pastuszak AW, Hanson HA, Hotaling JM. Harnessing the full potential of reproductive genetics and epigenetics for male infertility in the era of "big data". *Fertil Steril.* (2020) 113:478-488.
67. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reprod update* (2006) 12:417-435.
68. Tahmasbpour Marzouni E, Ilkhani H, Beigi Harchegani A, Shafaghatian H, Layali I, Shahriary A. Epigenetic Modifications, A New Approach to Male Infertility Etiology: A Review. *Int J Fertil Steril.* (2022) 16:1-9.
69. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* (2007) 2:e1289.
70. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, Vaiman D, Jouannet P, Tost J, Jammes H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* (2010) 18:73-80.
71. Vasco GC, Gil Villa AM, Piedrahita Ochoa C, Cardona Maya W, Cadavid Jaramillo A. Influencia de la impronta genómica masculina en la reproducción [Influence of the male genomic imprinting on the reproduction]. *Actas urológicas españolas* (2008). 32:1004-1012.
72. Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod.* (2011) 26:2558-69.

73. Rotondo JC, Lanzillotti C, Mazziotta C, Tognon M, Martini F. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Front Cell Dev Biol.* (2021) 9:689624.
74. Chan SY, Wan CWT, Law TYS, Chan DYL, Fok EKL. The Sperm Small RNA Transcriptome: Implications beyond Reproductive Disorder. *Int J Mol Sci.* (2022) 23:15716.
75. Milward EA, Shahandeh A, Heidari M, Johnstone D, Daneshi N, Hondermarck H. *Transcriptomics* (2015) 10.1016/B978-0-12-394447-4.40029-5.
76. Wright CJ, Smith CWJ, Jiggins CD. Alternative splicing as a source of phenotypic diversity. *Nat Rev Genet.* (2022) 23:697-710.
77. Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, Mathieu R, Feig C, Demougin P, Gattiker A, Schulze W, Jégou B, Kirchhoff C, Primig M. Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Hum Reprod.* (2012) 27:3233-48. 22926843.
78. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* (2014) 13:397-406.
79. Kouadjo KE, Nishida Y, Cadrin-Girard JF, Yoshioka M, St-Amand J. Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics.* (2007) 8:127.
80. de la Grange P, Gratadou L, Delord M, Dutertre M, Auboeuf D. Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res.* (2010) 38:2825-38.
81. Kan Z, Garrett-Engle PW, Johnson JM, Castle JC. Evolutionarily conserved and diverged alternative splicing events show different expression and functional profiles. *Nucleic Acids Res* (2005) 33:5659-66.
82. Xu Q, Modrek B, Lee C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3754-66.
83. Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* (2004) 5:R74.
84. Voolstra C, Tautz D, Farbrother P, Eichinger L, Harr B. Contrasting evolution of expression differences in the testis between species and subspecies of the house mouse. *Genome Res* (2007) 17:42-9.
85. Chalmel F, Rolland AD. Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction* (2015) 150:R149-57.
86. Solari AJ. The behavior of the XY pair in mammals. *International review of cytology* (1974). 38: 273-317.
87. McKee BD, Handel MA. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* (1993) 102:71-80.
88. Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development (Cambridge, England)* (2007). 134:1823-1831.



89. Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* (2006) 16:660-7.
90. Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JM. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet.* (2008) 40:794-9.
91. Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* (2004) 36:642-6.
92. He Z, Chan WY, Dym M. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction* (2006) 132:11-9.
93. Waclawska A, Kurpisz M. Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med* (2012) 58:229-35
94. Lardone MC, Parodi DA, Valdevenito R, Ebensperger M, Piottante A, Madariaga M, et al. Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* (2007) 13:705-12
95. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* (2012) 29:3-10.
96. Jodar M, Kalko S, Castillo J, Ballescà JL, Oliva R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* (2012) 27:1431-8.
97. Hashemi MS, Mozdarani H, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Among seven testis-specific molecular markers, SPEM1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men. *Andrology* (2018) 6:890-895.
98. García-Herrero S, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril.* (2010) 94:1360-1373.
99. García-Herrero S, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* (2011) 22:25-36.
100. Jodar M, Sandler E, Moskovtsev SI, Librach CL, Goodrich R, Swanson S, Hauser R, Diamond MP, Krawetz SA. Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility. *Sci Transl Med.* (2015) 7:295re6.
101. Burl RB, Clough S, Sandler E, Estill M, Krawetz SA. Sperm RNA elements as markers of health. *Syst Biol Reprod Med.* (2018) 64:25-38.
102. Holt JE, Stanger SJ, Nixon B, McLaughlin EA. Non-coding RNA in Spermatogenesis and epididymal maturation. In: Wilhelm D, Bernard P, editors. *Noncoding RNA and the Reproductive System.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2016:95-120.
103. Rastetter RH, Smith CA, Wilhelm D. The role of non-coding RNAs in male sex determination and differentiation. *Reproduction.* (2015) 150:R93-107.

104. Luk AC, Chan WY, Rennert OM, Lee TL. Long noncoding RNAs in spermatogenesis: insights from recent high-throughput transcriptome studies. *Reproduction* (2014) 147:R131-41.
105. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* (2011) 43:904-14.
106. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* (2009)136:215-33.
107. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) 12:246-58.
108. Robles V, Valcarce DG, Riesco MF. Non-coding RNA research non-coding rna regulation in reproduction: their potential use as biomarkers. *Non-coding RNA Res* (2019) 4:54-62.
109. Cui L, Fang L, Shi B, Qiu S, Ye Y. Spermatozoa micro ribonucleic acid-34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* (2015) 104:312-7.
110. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril* (2014) 102: 989-97.
111. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* (2011) 57:1722-31.
112. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod* (2013) 28:1827-36.
113. Xu Y, Zhang Y, Yang Y, Liu X, Chen Y. Seminal plasma miR-210-3p is a biomarker for screening dyszoospermia caused by varicocele. *Andrologia* (2019) 51:1-8.
114. Hong Y, Wang C, Fu Z, Liang H, Zhang S, Lu M, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci Rep* (2016) 6:1-10.
115. Barcelo M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod* (2018) 33:1087-98.
116. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* (1999) 17:121-7.
117. Rogers S, Girolami M, Kolch W, Waters KM, Liu T, Thrall B, Wiley HS. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* (2008) 24:2894-900.
118. Egea RR, Puchalt NG, Escrivá MM, Varghese AC. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J Hum Reprod Sci* (2014) 7:73-92.
119. Assidi M. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells* (2022) 11:1711.
120. Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl* (2009) 11:484-91.

121. Parte PP, Rao P, Redij S, Lobo V, D'Souza SJ, Gajbhiye R, Kulkarni V. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *J Proteomics* (2012) 75:5861-71.
122. Hashemitabar M, Sabbagh S, Orazizadeh M, Ghadiri A, Bahmanzadeh M. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:853-63.
123. Liu Y, Guo Y, Song N, Fan Y, Li K, Teng X, Guo Q, Ding Z. Proteomic pattern changes associated with obesity-induced asthenozoospermia. *Andrology* (2015) 3:247-59.
124. Liu X, Wang W, Zhu P, Wang J, Wang Y, Wang X, Liu J, Li N, Wang X, Lin C, Liu F. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reprod Biomed Online* (2018) 37:467-479.
125. Panner Selvam MK, Agarwal A, Pushparaj PN, Baskaran S, Bendou H. Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes (Basel)* (2019) 10:522.
126. Hosseinifar H, Gourabi H, Salekdeh GH, Alikhani M, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, Modarresi T, Gilani MA. Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. *Urology* (2013) 81:293-300.
127. Hosseinifar H, Sabbaghian M, Nasrabadi D, Modarresi T, Dizaj AV, Gourabi H, Gilani MA. Study of the effect of varicocelectomy on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis. *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:725-9.
128. Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Ayaz A, Cui Z, Willard B, Gopalan B, Sabanegh E. Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. *Reprod Biol Endocrinol* (2015) 13:8.
129. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, Bertolla RP, Fraietta R. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril* (2013) 99:92-98.
130. Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Björndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod.* (2004) 19:1438-47.
131. Frapsauce C, Pionneau C, Bouley J, de Larouzière V, Berthaut I, Ravel C, Antoine JM, Soubrier F, Mandelbaum J. Infertilité masculine chez les patients normospermiques : analyse protéomique des spermatozoaires normaux non fécondants en fécondation in vitro classique [Unexpected in vitro fertilization failure in patients with normal sperm: a proteomic analysis]. *Gynecol Obstet Fertil* (2009) 37:796-802. French.
132. Zhu Y, Wu Y, Jin K, Lu H, Liu F, Guo Y, Yan F, Shi W, Liu Y, Cao X, Hu H, Zhu H, Guo X, Sha J, Li Z, Zhou Z. Differential proteomic profiling in human spermatozoa that did or did not result in pregnancy via IVF and AID. *Proteomics Clin Appl.* (2013) 7:850-8.

133. Kanannejad Z, Gharesi-Fard B. Difference in the seminal plasma protein expression in unexplained infertile men with successful and unsuccessful in vitro fertilisation outcome. *Andrologia* (2019) 51:e13158.
134. Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, Novin MG, Aabed F, Taheri H, Fadaei F, Mohsenzadeh M, Jafari M, Pirouzi A, Heidari R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* (2013) 80:718-24.
135. Llavanera M, Delgado-Bermúdez A, Ribas-Maynou J, Salas-Huetos A, Yeste M. A systematic review identifying fertility biomarkers in semen: a clinical approach through Omics to diagnose male infertility. *Fertil Steril* (2022) 118:291-313.
136. Intasqui P, Camargo M, Antoniassi MP, Cedenho AP, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. *Fertil Steril* (2016) 105:617-28.
137. Intasqui P, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Bertolla RP. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: a sperm proteomic approach. *Andrologia* (2017) 50:1-11.
138. Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, Novin MG, Aabed F, Taheri H, Fadaei F, Mohsenzadeh M, Jafari M, Pirouzi A, Heidari R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* (2013) 80:718-24.
139. Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, Spilker ME, Siuzdak G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nat Biotechnol* (2018) 36:316-20.
140. Hamamah S, Seguin F, Barthelemy C, Akoka S, Le Pape A, Lansac J, Royere D. 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *J Reprod Fertil* (1993) 97 51-5.
141. Jayaraman V, Ghosh S, Sengupta A, Srivastava S, Sonawat HM, Narayan PK. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:1195-204.
142. Zhang X, Diao R, Zhu X, Li Z, Cai Z. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. *Clin Chim Acta* (2015) 450:254-61.
143. Gilany K, Moazeni-Pourasil RS, Jafarzadeh N, Savadi-Shiraz E. Metabolomics fingerprinting of the human seminal plasma of asthenozoospermic patients. *Mol Reprod Dev* (2014) 81:84-6.
144. Gilany K, Jafarzadeh N, Mani-Varnosfaderani A, Minai-Tehrani A, Sadeghi MR, Darbandi M, Darbandi S, Amini M, Arjmand B, Pahlevanzadeh Z. Metabolic Fingerprinting of Seminal Plasma from Non-obstructive Azoospermia Patients: Positive Versus Negative Sperm Retrieval. *J Reprod Infertil.* (2018) 19:109-114.
145. Mumcu A, Karaer A, Dogan B, Tuncay G. Metabolomics analysis of seminal plasma in patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia using highresolution NMR spectroscopy. *Andrology* (2020) 8:450-6.
146. Xu Y, Lu H, Wang Y, Zhang Z, Wu Q. Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their

- correlation with sperm parameters. *J Pharm Biomed Anal* (2020) 177:112888.
147. Guo Y, Li J, Hao F, Yang Y, Yang H, Chang Q, Kong P, Liu W, Jiao X, Teng X. A new perspective on semen quality of aged male: The characteristics of metabolomics and proteomics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. (2023) 13:1058250.
  148. Neto FTL, Marques RA, de Freitas Cavalcanti Filho A, Araujo LCN, Lima SVC, Pinto L, Silva RO. 1H NMR-based metabolomics for infertility diagnosis in men with varicocele. *J Assist Reprod Genet* (2020) 37:2233-2247.
  149. Zhang J, Huang Z, Chen M, Xia Y, Martin FL, Hang W, Shen H. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. *Fertil Steril* (2014) 102:44-53.e12.
  150. Zhou X, Wang Y, Yun Y, Xia Z, Lu H, Luo J, Liang Y. A potential tool for diagnosis of male infertility: Plasma metabolomics based on GC-MS. *Talanta* (2016) 147:82-9.
  151. Kołodziejczyk J, Blixt O, Olejnik B, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. Application of lectin microarrays for the analysis of seminal plasma glycome. *Andrologia* (2018)50:e13018.
  152. Walters JLH, Gadella BM, Sutherland JM, Nixon B, Bromfield EG. Male infertility: shining a light on lipids and lipid-modulating enzymes in the male germline. *J Clin Med* (2020) 9:327.
  153. Rivera-Egea R, Garrido N, Sota N, Meseguer M, Remohí J, Dominguez F. Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* (2018) 35:1973-1985.
  154. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated omics: tools, advances, and future approaches. *J Mol Endocrinol* (2019) 62:R21-45.
  155. Wang M, Liu X, Chang G, Chen Y, An G, Yan L, Gao S, Xu Y, Cui Y, Dong J, Chen Y, Fan X, Hu Y, Song K, Zhu X, Gao Y, Yao Z, Bian S, Hou Y, Lu J, Wang R, Fan Y, Lian Y, Tang W, Wang Y, Liu J, Zhao L, Wang L, Liu Z, Yuan R, Shi Y, Hu B, Ren X, Tang F, Zhao XY, Qiao J. Single-Cell RNA Sequencing Analysis Reveals Sequential Cell Fate Transition during Human Spermatogenesis. *Cell Stem Cell*. (2018) 23:599-614.e4.
  156. La H, Yoo H, Lee EJ, Thang NX, Choi HJ, Oh J, Park JH, Hong K. Insights from the Applications of Single-Cell Transcriptomic Analysis in Germ Cell Development and Reproductive Medicine. *Int J Mol Sci*. (2021) 22:823.
  157. Sinha A, Singh V, Yadav S. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Front Biosci (Schol Ed)*. (2017) 9:375-394.
  158. Jumeau F, Chalmel F, Fernandez-Gomez FJ, Carpentier C, Obriot H, Tardivel M, et al. Defining the human sperm microtubulome: an integrated genomics approach. *Biol Reprod* (2017) 96:93-106.
  159. Talluri TR, Kumaresan A, Sinha MK, Paul N, Ebenezer Samuel King JP, Datta TK. Integrated multi-omics analyses reveals molecules governing sperm metabolism potentially influence bull fertility. *Sci Rep* (2022) 12:10692.

# LA ANDROLOGÍA EN LA ERA DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: LA IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA GENÉTICA

R. John Aitken<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Prioritario para Ciencias Reproductivas, Disciplina de Ciencias Biológicas, Escuela de Ciencias Ambientales y de la Vida, Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Medio Ambiente, Universidad de Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia. <sup>2</sup>Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, NSW, 2305, Australia.

Autor Corresponsal: Dr. John Aitken. Correo electrónico: [john.aitken@newcastle.edu.au](mailto:john.aitken@newcastle.edu.au)

## Resumen

Se cree que el "factor masculino" es responsable de al menos el 50% de toda la infertilidad en todo el mundo. A pesar de la importancia clínica de esta condición, es decepcionante observar que hemos avanzado muy poco hacia la resolución de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Este escaso progreso es en parte un reflejo de nuestro limitado conocimiento de las vías fundamentales de desarrollo que sustentan la generación de espermatozoides funcionales capaces de fertilizar el ovocito *in vivo*. Paradójicamente, esta infeliz circunstancia se ha visto exacerbada por la introducción de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la práctica clínica habitual. En el lado positivo, el advenimiento de la ICSI ha permitido a muchos hombres gravemente infértiles tener hijos cuando su condición clínica estaba fuera del alcance de la fecundación *in vitro* convencional. Sin embargo, este avance técnico tuvo una consecuencia inesperada, ya que desalentó la investigación sobre las causas fundamentales de la infertilidad masculina y, en cambio, se convirtió en un tratamiento predeterminado para todas las formas de infertilidad humana, independientemente de su etiología. Afortunadamente, este estado de cosas está mejorando gradualmente, en parte como un reflejo de nuestra creciente conciencia de que el tratamiento de los hombres infértiles no debe diseñarse solo para lograr el embarazo, sino para garantizar el nacimiento de un niño sano que tendrá una salud normal a lo largo de su vida. Dado que las mutaciones *de novo* se generan predominantemente en la línea germinal masculina, la calidad del espermatozoide fertilizante es un determinante crítico de la salud de la descendencia. Por lo tanto, si bien la andrología aún puede ser una disciplina en su infancia, se está progresando gradualmente en la comprensión de cómo la calidad del semen se relaciona con la fertilidad y la salud de la descendencia. En la era de las técnicas de reproducción asistida, han surgido dos factores principales de suma importancia: el estrés oxidativo y la integridad del ADN.

## Introducción

La tecnología de reproducción asistida (TRA) se desarrolló originalmente como un método para abordar la obstrucción tubárica bilateral, que representaba la principal causa de infertilidad en la Gran Bretaña de la posguerra (1). Sin embargo, pronto se hizo evidente que la TRA podría usarse para abordar otras formas de patología reproductiva, particularmente cuando esto involucraba infertilidad idiopática o defectos en los espermatozoides que impedían que estas células participaran en la fertilización *in vivo* (2,3). Por ejemplo, los hombres que muestran autoinmunidad

contra los antígenos de los espermatozoides (4), los hombres con azoospermia u oligozoospermia obstructiva (5) y los hombres cuyos espermatozoides no logran ascender el tracto reproductivo femenino al lugar de fertilización (6) podrían ser tratados con una técnica simplemente diseñado para lograr la yuxtaposición física de espermatozoides y ovocitos. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología a la infertilidad masculina claramente tiene sus límites cuando existe una motilidad deficiente y altos niveles de infiltración leucocítica identificados como las principales causas de fertilización fallida *in vitro* (3). Posteriormente, se dedicó un gran esfuerzo a probar la capacidad de una variedad de compuestos para promover la funcionalidad de los espermatozoides *in vitro*, incluida la cafeína (7), la pentoxifilina (8) y la 2-desoxiadenosina (9). Además, se desarrollaron metodologías, como la centrifugación por gradiente de densidad, con la separación cuidadosa de los espermatozoides de los leucocitos infiltrantes y las células germinales (10). Sin embargo, todas estas intervenciones se volvieron esencialmente redundantes con la aparición de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que esencialmente evita todos los procesos biológicos asociados con el reconocimiento y la fusión de gametos (11). A raíz de la introducción de ICSI, los médicos dejaron de hacer preguntas sobre aspectos fundamentales de la salud reproductiva masculina y, durante un tiempo significativo, vimos poco progreso en los métodos que utilizamos para evaluar la calidad del semen, nuestra comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes o el desarrollo de técnicas terapéuticas mejoradas que se centran en el hombre infértil y no en su inocente pareja femenina fértil.

Como resultado, el interés clínico en la infertilidad por factor masculino disminuyó hasta tal punto de que en las últimas dos décadas la única pregunta que se le ha hecho a la pareja masculina ha sido si tiene o no un número suficiente de espermatozoides para realizar ICSI. La competencia funcional de los espermatozoides se consideró irrelevante. En los casos en que los espermatozoides no estaban presentes en cantidades adecuadas debido a obstrucción o hipospermatogénesis, se desarrollaron técnicas quirúrgicas innovadoras para recuperar espermatozoides del epidídimo o los testículos para permitir el tratamiento mediante el procedimiento ICSI. Este enfoque ciertamente ha tenido éxito al permitir conseguir embarazos viables en pacientes que exhiben formas obstructivas y no obstructivas de oligozoospermia grave (12). A pesar de que los resultados de tales enfoques microquirúrgicos para el tratamiento de la infertilidad fueron significativamente mejores cuando se involucró la obstrucción (13), el éxito evidente de la ICSI en el tratamiento de la infertilidad masculina grave ha limitado el interés de la investigación en la comprensión de las causas múltiples de esta afección y, a la luz de esta información, la creación de nuevos enfoques para el diagnóstico y el tratamiento. En lugar de centrarse en una etiología, la tendencia actual es idear métodos cada vez más ingeniosos para recuperar, o incluso generar, espermatozoides para ICSI.

### **La futura generación de gametos *in vitro***

Científicamente, las etapas terminales de la diferenciación de espermatozoides (espermiogénesis) durante las cuales las células precursoras haploides, las espermátidas, se diferencian en espermatozoides, es un proceso biológico notable. Tal fascinación existe, porque esta transformación dramática en uno de los tipos de células más especializados del cuerpo ocurre en ausencia completa de transcripción de genes *de novo*. Es durante la espermiogénesis que una espermátida esférica poco notable e indiferenciada se convierte en un espermatozoide capaz de hacer la transición de un individuo a otro, localizando solo otro tipo de célula en el huésped (el ovocito) y luego participando en una cascada de interacciones celulares que conducen a una serie de eventos de fusión de membranas, como la reacción del acrosoma y la fusión espermatozoide-ovocito, que culminan en el inicio del desarrollo embrionario. Recrear la diferenciación de un tipo de célula tan complejo *in vitro* es extremadamente complicado; sin embargo, no es imposible. Ya se han logrado algunos avances en la generación de espermátidas a partir de células madre pluripotentes y embrionarias (14,15) y estas células haploides han demostrado ser capaces de generar descendencia fértil. En los mamíferos, orquestar condiciones que luego permitan que estas espermátidas derivadas de células madre se diferencien en espermatozoides *in vitro* ha sido un desafío. Sin embargo, la diferenciación *in vitro* de la espermatogonia en espermatozoides funcionales capaces tanto de la fecundación como de la inducción del desarrollo embrionario se ha logrado en una especie teleostea, el durmiente de cuatro ojos (*Bostrychus sinensis*) (16). Además, es prometedor un informe reciente que describe la generación de células haploides, que eran morfológicamente similares a los espermatozoides, a partir de células testiculares de ratón neonatales utilizando testículos artificiales biodiseñados a través de la impresión 3D de la matriz extracelular derivada de los testículos (17). Las espermátidas también se han generado *in vitro*

mediante el cultivo de células madre embrionarias de primates macaco rhesus. Posteriormente, se demostró que estas células haploides eran capaces de fertilizar óvulos utilizando ICSI e iniciar el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto (18). Aunque la funcionalidad de tales espermatozoides generados *in vitro* aún no se ha confirmado, hay suficiente impulso en este campo para sugerir que la generación exitosa de espermatozoides a partir de células madre *in vitro* es una propuesta realista en un futuro lejano. Sin embargo, hay muchos obstáculos técnicos, genéticos, epigenéticos y éticos que superar antes de que esto se convierta en una realidad. Mientras tanto, tenemos que tratar de mejorar la calidad del semen *in vivo*. En este contexto, el trabajo avanza lentamente en el esclarecimiento de las diversas causas de la infertilidad masculina y el desarrollo de modalidades terapéuticas que se basan en un conocimiento de los factores que contribuyen a esta condición.

## **El diagnóstico de la infertilidad masculina**

En los últimos 20 años, dos factores principales han surgido como altamente relevantes para los orígenes de esta infertilidad masculina: el estrés oxidativo y la mutación genética. El progreso en cada una de estas áreas de investigación se resume a continuación.

**Estrés oxidativo.** Hemos sido conscientes de que el estrés oxidativo es un factor clave en la etiología de la infertilidad masculina, ya que la importancia de la vitamina antioxidante, alfa-tocoferol, para la función reproductiva masculina se estableció por primera vez en las décadas de 1930 y 40 (19). Se cree que el estrés oxidativo surge como resultado de deficiencias en los niveles de protección antioxidante proporcionados a los espermatozoides y / o la exposición de estas células al exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) con un origen tanto extra como intracelular (Figura 1). Los espermatozoides son particularmente vulnerables al estrés oxidativo por varias razones. En primer lugar, estas células altamente especializadas se caracterizan por el volumen limitado y la distribución restringida del espacio de citoplasma en el que albergar los factores antioxidantes que protegen a la mayoría de los tipos de células somáticas del ataque oxidativo. Como consecuencia, son altamente dependientes de la protección que brindan los antioxidantes ubicados en el espacio extracelular. En el tracto reproductivo masculino esta protección antioxidante es proporcionada en gran medida por las secreciones líquidas del tubo seminífero y el epidídimo y, en el momento de la eyaculación, por el plasma seminal. Después de la inseminación, estas células están protegidas por factores antioxidantes en la luz del tracto reproductivo femenino.

En general, la protección antioxidante es proporcionada por una combinación de secuestradores de radicales libres de pequeño peso molecular y enzimas antioxidantes (20). Estos últimos incluyen sistemas enzimáticos antioxidantes ampliamente distribuidos, como las formas mitocondriales y citoplasmáticas de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, las peroxiredoxinas (particularmente la peroxiredoxina 6) y la glutatión peroxidasa. Además, hay isoformas de enzimas antioxidantes que desempeñan un papel más especializado dentro del tracto reproductivo masculino, incluida una forma secretora de superóxido dismutasa. Los secuestradores de radicales libres de pequeño peso molecular en el tracto reproductivo masculino y femenino incluyen taurina, ácido úrico, vitamina E, vitamina C, selenio, zinc, L arginina y glutatión (21). En principio, las deficiencias en tales antioxidantes podrían ser una causa importante de estrés oxidativo y, por lo tanto, de una función defectuosa de los espermatozoides en pacientes con infertilidad (22). Los análisis de la capacidad antioxidante total de las muestras de semen humano indican claramente una diferencia en los niveles de protección antioxidante observados en hombres infértiles frente a fértiles (23), mientras que se han observado deficiencias en factores antioxidantes específicos como el selenio y la vitamina E en hombres infértiles. Además, en varios (24) pero no en todos (23) se ha observado una correlación significativa entre los niveles de antioxidantes observados en el plasma seminal y la circulación general. Tales observaciones son importantes porque sugieren que la falta de protección antioxidante proporcionada a los espermatozoides por el plasma seminal puede reflejar una deficiencia sistémica que no se limita al tracto reproductivo. Condiciones como la adiposidad, la mala alimentación, la exposición a tóxicos ambientales y las infecciones virales que conducen a un estado proinflamatorio generalizado, podrían contribuir a tal deficiencia sistémica de antioxidantes. Alternativamente, sería posible imaginar situaciones como una infección localizada del tracto genital que conduzca a la infiltración leucocítica en las glándulas sexuales secundarias, que agotaría los antioxidantes en la eyaculación, sin afectar los niveles de protección antioxidante registrados en la circulación. Del



mismo modo, se sabe que la presencia de un varicocele conduce a un aumento del estrés oxidativo reflejado por las concentraciones de malondialdehído seminal (MDA) (25-27) que probablemente se localice en el tracto masculino.

Dada la multitud de factores que pueden influir en los niveles de protección antioxidante observados en diferentes compartimentos celulares, cada individuo probablemente tendrá su propio perfil único de protección / deficiencia antioxidante, lo que dificulta la generalización. Además, la relación propuesta entre deficiencia antioxidante e infertilidad masculina es a menudo asociativa más que claramente causal (28). Sin embargo, los estudios que muestran correlaciones claras entre la deficiencia de antioxidantes y los marcadores de estrés oxidativo, como el aumento de la expresión de aldehídos lipídicos, como el malondialdehído (MDA), demuestran que existen relaciones causales (24). De hecho, el hecho de que los bajos niveles de MDA seminal se hayan asociado repetidamente con una excelente calidad del semen, apoya claramente una cadena propuesta de causa y efecto entre la deficiencia de antioxidantes, el estrés oxidativo y la mala calidad del semen (29). Dados los vínculos evidentes entre la protección antioxidante agotada, el estrés oxidativo y la calidad del semen, se ha propuesto que un enfoque sensible para identificar a los pacientes adecuados para el tratamiento con suplementos antioxidantes sería medir la proporción de protección antioxidante y agresión prooxidante en muestras de semen humano (Figura 1). Por ejemplo, la luminometría se ha utilizado para medir la relación entre la actividad antioxidante total (TAC) y la generación de ROS en pacientes con infertilidad masculina con gran efecto (30). Una medida aún más sólida podría ser calcular la relación MDA: TAC, aunque este enfoque no parece haber sido considerado en un contexto reproductivo. Un ensayo que proporcionara datos sobre la relación aldehído lipídico: TAC, sería una ventaja considerable para identificar a los pacientes en los que el estrés oxidativo contribuye de manera importante a su baja fertilidad.

Tales desarrollos técnicos son importantes porque presentan un medio simple y efectivo para seleccionar pacientes para la terapia antioxidante. Hasta la fecha, el uso de tratamiento antioxidante para abordar la infertilidad masculina ha sido una enorme pérdida de tiempo y de recursos. Aunque se han realizado muchos ensayos, una revisión Cochrane reciente de los datos disponibles concluyó que *"hay evidencia de certeza muy baja ... lo que sugiere que la suplementación con antioxidantes en hombres subfértiles puede mejorar las tasas de nacidos vivos para las parejas que asisten a clínicas de fertilidad. Todavía se necesitan ensayos aleatorios controlados con placebo de gran tamaño y bien diseñados que estudien a hombres infértiles e informen sobre el embarazo y los nacidos vivos para aclarar el papel exacto de los antioxidantes"* (31). Uno de los principales problemas con tales ensayos es que rara vez se selecciona a los pacientes sobre la base del estrés oxidativo (32). Los pacientes incorporados a tales ensayos son generalmente simplemente hombres infértiles o hombres que sufren de astenozoospermia. Muy raramente se han realizado ensayos clínicos en los que los pacientes fueron seleccionados sobre la base de una medición del estrés oxidativo, como la formación de MDA o incluso la generación de ROS. El tratamiento antioxidante de pacientes que no sufren de estrés oxidativo no solo no tiene sentido, sino que en realidad puede ser perjudicial porque corre el peligro de crear estrés reductor, que a su vez es perjudicial para la función de los espermatozoides (33). En los sistemas biológicos, el objetivo es crear un equilibrio redox mediante el cual la provisión y aceptación de electrones esté en equilibrio dinámico (Figura 1). El estrés oxidativo (un déficit de electrones) o el estrés reductor (un exceso de electrones) son dañinos. Por lo tanto, es esencial, cuando diseñamos tales ensayos, que la terapia antioxidante solo se administre a aquellos pacientes para los que hay evidencia de estrés oxidativo.

Por lo tanto, es fundamental el desarrollo de sistemas sencillos en el punto de atención para detectar dicho estrés como preludeo a la prescripción de una terapia antioxidante. Si bien existen diversas técnicas bioquímicas para detectar definitivamente el estrés oxidativo en los sistemas biológicos, incluidos los métodos que se basan en resultados complejos y sofisticados de espectrometría de masas (34), tales técnicas no son útiles para la evaluación de rutina de los pacientes en un contexto clínico. Una solución innovadora a este problema ha sido medir el potencial óxido-reductor estático (sORP) o el potencial redox del semen humano como un medio simple para detectar el estado redox de la eyaculación. El potencial redox se refiere al equilibrio de compuestos oxidantes y reductores en cualquier sistema dado. Un alto potencial sugiere que el sistema está fuertemente ponderado hacia compuestos oxidados que son altamente receptivos a la donación de electrones. Por el contrario, un potencial redox negativo sugiere que los

compuestos reducidos dominan el sistema y están listos para renunciar a sus electrones para mantener un equilibrio redox. Aunque un bajo potencial redox sugiere la presencia de abundante protección antioxidante, depende de la naturaleza de los compuestos que mantienen el equilibrio redox. Sin embargo, en general, las mediciones del potencial redox se han encontrado útiles para revelar los oxidantes y antioxidantes en fluidos biológicos y, como tal, se ha encontrado aplicación en muchas áreas de la práctica clínica (35). Desafortunadamente, la aplicación de métodos potenciales redox a la infertilidad masculina ha estado envuelta en controversia. Los informes iniciales con el sistema MyOXSYS para medir el potencial oxido-reductor en eyaculaciones humanas parecían prometedores, proporcionando evidencia de asociaciones significativas con elementos del perfil de semen convencional, así como correlaciones débiles (típicamente  $r = 0.25-0.45$ ) con las tasas de fertilización, embarazo clínico y tasas de nacidos vivos en programas de concepción asistida (36,37). Sin embargo, tales asociaciones parecen estar profundamente influenciadas por la forma en que se expresan los resultados. En lugar de simplemente expresar la lectura de sORP en mV, como es la práctica convencional, los defensores del sistema MyOXSYS generaron un índice dividiendo la lectura de sORP por el recuento de espermatozoides (sORP mV /  $10^6$  espermatozoides / ml). Como resultado de este enfoque, el índice sORP está obviamente altamente correlacionado con el conteo de espermatozoides y parcialmente correlacionado con todos los otros atributos de la calidad del semen (por ejemplo, motilidad, morfología y daño al ADN) que están intrínsecamente asociados con el número de espermatozoides. La razón detrás de este enfoque no está clara. La medición de sORP no cambia significativamente si los espermatozoides se eliminan del semen y todas las correlaciones relacionadas con la calidad del semen desaparecen cuando el recuento de espermatozoides no se utiliza como denominador en la creación del índice sORP (38). Por lo tanto, si bien la medición de sORP es una sugerencia perfectamente sensata, los datos generados con MyOXSYS en el pasado reciente son problemáticos, debido a la forma en que se han expresado los resultados. La necesidad de una técnica diagnóstica eficaz para detectar el estrés en las eyaculaciones humanas sigue existiendo, pero es evidente que hay que realizar más estudios para encontrar un método sensible validado para realizar tales evaluaciones. Hay cierta urgencia para lograr este objetivo. Una industria comercial masiva se ha desarrollado en torno al uso de suplementos antioxidantes para tratar la infertilidad masculina (39-41) que no pueden alcanzar su máximo potencial hasta que se hayan desarrollado métodos efectivos y confiables para monitorizar el estrés oxidativo en pacientes con infertilidad masculina. La medición del potencial redox puede ser una solución a este problema, pero los métodos actuales para adquirir y expresar estos datos deben ser reexaminados.

### **Consecuencias genéticas de la infertilidad masculina en la descendencia**

Una de las consecuencias del estrés oxidativo en la línea germinal masculina es la inducción del daño oxidativo del ADN en los espermatozoides. Cuando los espermatozoides se colocan bajo niveles crecientes de estrés oxidativo, es notable que pierden su integridad de ADN antes de perder su capacidad de fertilización (42). Como consecuencia, es bastante posible que un espermatozoide que transporta ADN oxidativamente dañado logre la fertilización. Las bases de ADN oxidadas en tales espermatozoides, particularmente 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG), son extremadamente mutagénicas y podrían resultar en un aumento de la carga mutacional en la descendencia que luego puede afectar su trayectoria de salud de por vida. Por ejemplo, el aumento significativo en el riesgo de cáncer infantil asociado con el tabaquismo paterno podría estar razonablemente asociado con el daño oxidativo del ADN que este hábito induce en los espermatozoides (43,44). De hecho, el tabaquismo paterno ha sido probablemente responsable de introducir millones de mutaciones en nuestra especie (45) desde que Cristóbal Colón descubrió el tabaco en 1492. Por supuesto, fumar no es el único estilo de vida o factor ambiental capaz de inducir daño oxidativo en el ADN en espermatozoides humanos. Una amplia gama de factores, desde la radiación electromagnética, la obesidad, la infección, la criopreservación y los contaminantes químicos comunes como el bisfenol A, pueden afectar potencialmente la carga

mutacional transportada por los niños como resultado de la reparación aberrante del daño del ADN de los espermatozoides en el ovocito (46, 33). De todas estas diversas causas de daño oxidativo del ADN en espermatozoides humanos, quizás la más importante es la subfertilidad en sí. Los niveles de 8OHdG en la cromatina espermática son significativamente elevados en los hombres que asisten a clínicas de infertilidad (47,48). De acuerdo con la hipótesis de la "colusión de ovocitos post-meióticos" (33) la reparación aberrante de dicho daño después de la fertilización *in vitro* aumentará la carga mutacional posteriormente transportada por la descendencia, particularmente cuando se utiliza ICSI como técnica de inseminación. De hecho, la evidencia en apoyo de esta hipótesis ya ha surgido a la luz de un estudio reciente que informa un aumento significativo en la incidencia de mutaciones espontáneas de *novo* en la descendencia concebida por concepción asistida (49). Es importante destacar que el 87.9% de tales mutaciones se originaron en la línea germinal paterna y se asociaron con infertilidad en el padre (49,33). La principal mutación observada en estas circunstancias, las sustituciones de C>T en sitios CpG, podría implicar factiblemente un ataque oxidativo a las citosinas en el núcleo espermático, como mecanismo mutacional primario (50).

Por lo tanto, el daño oxidativo del ADN en la línea germinal paterna puede estar asociado con una amplia gama de patologías en la descendencia como resultado del mecanismo mutacional descrito anteriormente. El cáncer infantil ya se ha mencionado en el contexto del tabaquismo paterno, pero también hay una amplia gama de afecciones neuropsiquiátricas (por ejemplo, autismo, esquizofrenia espontánea, enfermedad bipolar y epilepsia) que pueden tener un origen similar (32). En este contexto, puede ser significativo que el mapeo de los loci genéticos afectados por el daño oxidativo del ADN en espermatozoides humanos haya puesto de relieve la importancia del cromosoma 15 como particularmente vulnerable al ataque oxidativo (51). En términos de la salud y el bienestar de la descendencia, es notable que la región vulnerable en el cromosoma 15, se ha relacionado con trastornos complejos del desarrollo neurológico, incluido el síndrome de Prader-Willi (PWS), que puede implicar deleciones hereditarias paternas y disomía materna dentro de la región 15q11-q13, o síndrome de Angelmann, que implique deleciones maternas o disomía uniparental paterna de esta región cromosómica. Es importante destacar que las deleciones de *novo* en la copia paterna del cromosoma 15 representan ~70% de los casos de PWS (52). La existencia de informes que indican que los niños concebidos utilizando procedimientos de concepción asistida, exhiben una mayor prevalencia de trastornos de impronta como PWS (53) ciertamente sugiere un papel del daño oxidativo del ADN espermático en la aparición de esta condición. También se sabe que las alteraciones genéticas en esta y otras regiones del cromosoma 15 están involucradas en la etiología de los retrasos en el desarrollo, los trastornos del espectro autista, la susceptibilidad a la epilepsia, la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el síndrome de Marfan, los defectos cardíacos congénitos y el trastorno obsesivo-compulsivo (33). Curiosamente, la mayoría de estas condiciones están altamente correlacionadas con la edad del padre en el momento de la concepción, lo que, a su vez, se asocia con un aumento del estrés oxidativo en el semen y los espermatozoides, así como un aumento correspondiente en los niveles asociados a la edad de daño al ADN en la línea germinal (54-56). Por lo tanto, puede existir una cadena de causa y efecto con la edad aumentando los niveles de estrés oxidativo en los espermatozoides, lo que lleva a un daño oxidativo del ADN en el núcleo del espermatozoide que luego se fija como una mutación en el óvulo fertilizado como resultado de una reparación defectuosa, promoviendo así la aparición de enfermedades genéticas, como el autismo, en la descendencia (33). El hallazgo de que las tasas de autismo aumentan significativamente en los niños concebidos por ICSI en comparación con los concebidos naturalmente nuevamente respalda las asociaciones causales propuestas entre el daño oxidativo del ADN en los espermatozoides, la concepción asistida y la enfermedad neuropsiquiátrica en la descendencia (57).

### **Causas genéticas de la infertilidad masculina**

También se debe enfatizar que una de las condiciones ocasionadas en la descendencia por el daño del ADN en la línea germinal paterna puede ser la infertilidad, particularmente la infertilidad masculina. Existe un peso creciente de la evidencia que indica que los factores genéticos juegan un papel importante en la etiología de esta afección, como se revisó recientemente en profundidad (58). En cierto modo, las causas genéticas de la infertilidad parecen contradictorias porque no es posible heredar una mutación genética dominante que cause una falta de potencial fertilizante, por razones obvias. Cuando las mutaciones están involucradas en la causalidad de la infertilidad masculina, generalmente deben ser recesivas y mantenerse dentro de la población en la forma heterocigota o, solo en la línea germinal femenina, como recesivas homocigotas. Cuando surge

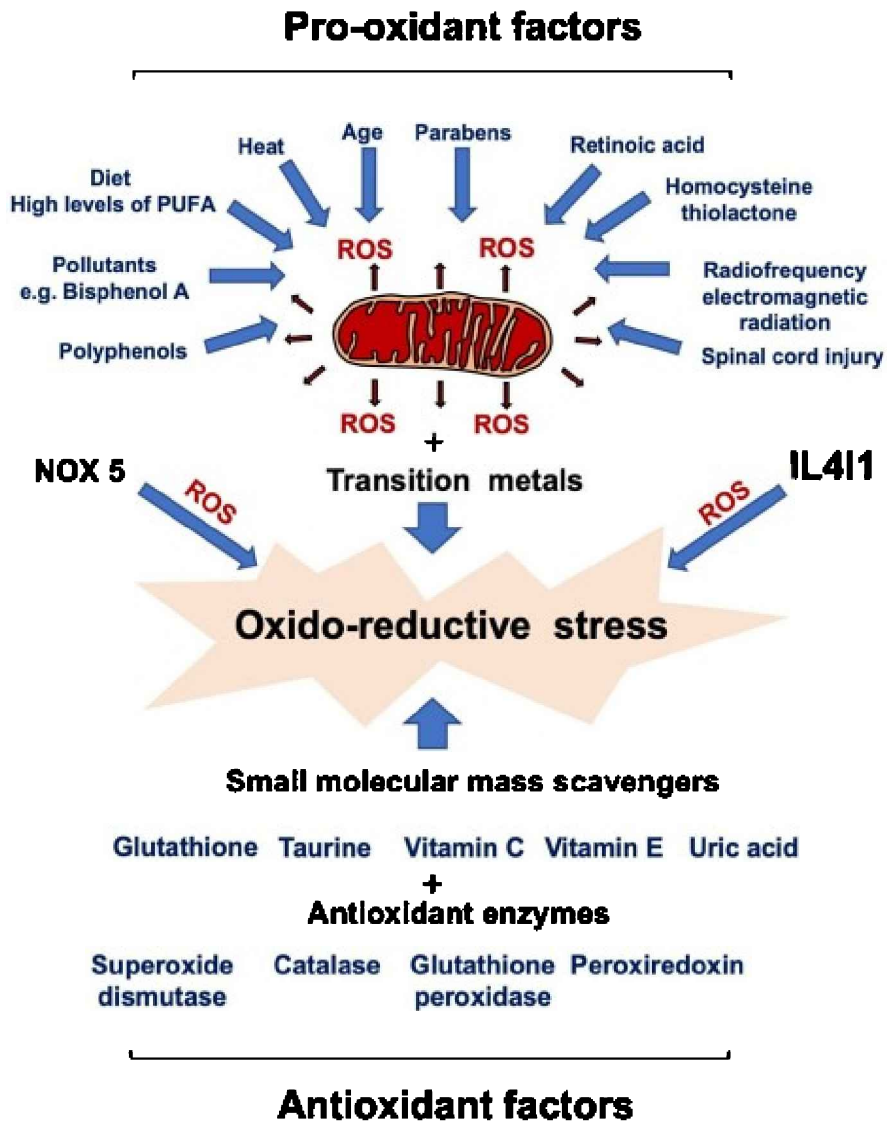
una mutación genética dominante capaz de inducir la infertilidad, tiene que ser una mutación espontánea *de novo*. Los ejemplos clásicos de mutaciones genéticas dominantes que surgen espontáneamente causan infertilidad masculina y luego se pierden porque no se pueden transmitir a la siguiente generación, son las deleciones del cromosoma Y. Estos últimos comprenden la causa genética más común de infertilidad masculina y generalmente se encuentran en hasta el 15% de los hombres con oligozoospermia o azoospermia (59), aunque esto varía considerablemente entre las poblaciones. En China, por ejemplo, el 10,8% de los hombres que exhiben azoospermia u oligozoospermia severa, transportan una microdeleción del cromosoma Y (60), mientras que análisis similares de hombres del norte de la India y Túnez encontraron que la incidencia fue del 8,5% (61) y del 2% (62) respectivamente. El hecho de que las mutaciones del cromosoma Y no se puedan heredar y, sin embargo, su incidencia sea tan alta, revela cuán comúnmente tales deleciones genéticas ocurren espontáneamente en la línea germinal masculina. La etiología de tales mutaciones es incierta en la actualidad, pero dado que tales deleciones están frecuentemente flanqueadas por secuencias palindrómicas, parece razonable proponer que la recombinación intracromosómica aberrante está involucrada, posiblemente secundaria a la inducción de la fragmentación del ADN (33).

A pesar de los mejores esfuerzos de la naturaleza para eliminar las mutaciones dañinas, generadoras de infertilidad y espontáneas de la población, tales salvaguardas pueden eludirse por completo mediante el uso de la terapia TRA, y la ICSI en particular. En el caso de las deleciones del cromosoma Y, el principal problema con tal enfoque terapéutico es que, si el proceso de fertilización asistida resulta en el parto de un hijo varón, heredará la misma deleción del cromosoma Y que poseía su padre y sufrirá la misma falta de fertilidad. Este patrón de causa y efecto también puede aplicarse a otras formas de mutación causante de infertilidad. Si la mutación suprime la fertilidad masculina al inducir defectos funcionales en los espermatozoides (por ejemplo, la diversa gama de mutaciones que resultan en defectos de la cola de los espermatozoides), entonces es perfectamente posible que dichos pacientes sean tratados por ICSI, promoviendo así la propagación del defecto genético en la próxima generación (58). Puede ser por esta razón que se ha encontrado que los hombres nacidos por ICSI poseen una calidad de semen más pobre que sus pares concebidos naturalmente (63). Un tema importante a considerar para los andrólogos es hasta qué punto la práctica clínica actual, particularmente el uso indiscriminado de ICSI, en realidad está promoviendo la infertilidad masculina en las generaciones futuras, en lugar de prevenirla. De hecho, cuando los procedimientos de concepción asistida se llevan a cabo a gran escala, existe un peligro inherente de que cuanto más usemos la TRA para resolver la infertilidad en una generación, más lo necesitaremos en la siguiente (64). Seguramente, en lugar de limitarse a dejar de usar TRA, los andrólogos del futuro, cuando se les presente un paciente infértil, abordarán la causa subyacente de la infertilidad en lugar de recurrir indiscriminadamente a la ICSI, colocando así toda la carga terapéutica sobre la pareja femenina.

## Conclusiones

La era de las técnicas de reproducción asistida ha tenido un gran compromiso sobre la práctica de la andrología, para bien y para mal. No cabe duda de que la introducción de la ICSI permitió a los varones severamente infértiles engendrar un hijo que de otra forma habría sido imposible. Sin embargo, la desventaja de esta innovación ha sido una contracción en los esfuerzos de investigación para tratar de entender por qué tantos hombres son infértiles. Además, el papel que la ICSI está desempeñando en el aumento de la carga mutacional espontánea, así como la incidencia de defectos congénitos manifiestos por parte de los niños concebidos por TRA, solo ahora está recibiendo una atención seria (65,49, 66). Claramente, la industria de la concepción asistida no solo debe estar interesada en generar embarazos *per se*, sino que debe hacer todo lo posible para garantizar que los niños que nacen como resultado de dicha terapia sean normales. Dado que la mayoría de las mutaciones espontáneas surgen en la línea germinal masculina, debemos asegurarnos de que los espermatozoides que se utilizan para fines de concepción asistida posean niveles muy bajos de daño en el ADN. Esto podría lograrse utilizando tecnologías avanzadas de selección de espermatozoides (67) o, dado que la mayor parte del daño al ADN en la línea germinal masculina es inducida oxidativamente, a través del uso juicioso de antioxidantes. En el futuro, se espera que los andrólogos continúen irrumpiendo en la etiología fundamental de la infertilidad masculina y los tratamientos actuales que abordan directamente la patología o, idealmente, eviten que surja una situación patológica en primera instancia. Podemos estar seguros de que la infertilidad masculina tiene muchas causas, por lo que el viaje será largo. Sin embargo, los conocimientos recientes sobre el papel del estrés oxidativo y las mutaciones

genéticas en la causalidad de esta afección representan un primer paso importante en la dirección correcta.



**Figura 1.** Un resumen de los factores que contribuyen al estrés oxidativo en la línea germinal masculina. Por un lado, una amplia variedad de factores ambientales y de estilo de vida, incluida la edad, la contaminación y la radiación electromagnética. Los conservantes y la lesión de la médula espinal pueden desencadenar la generación de ROS por espermatozoides, ya sea directamente o como consecuencia de inducir una forma truncada de apoptosis. Las ROS generalmente emanan de las mitocondrias, pero otros contribuyentes son posibles como la NADPH oxidasa, **NOX5**, o la L-aminoácido oxidasa, **IL411**. Es importante destacar que el impacto dañino de las ROS puede verse exacerbado por trazas de metales de transición como el hierro o el cobre. En general, el limitado espacio citoplasmático disponible para los espermatozoides limita su capacidad antioxidante intrínseca, creando un estado de vulnerabilidad. Sin embargo, los fluidos en los que estas células se bañan *in vivo* son altos y enriquecidos en factores antioxidantes que incluyen eliminadores de radicales libres de baja masa molecular y enzimas antioxidantes. Si la generación de ROS finalmente molesta la capacidad antioxidante de las células, entonces se induce un estado de estrés oxidativo que afecta la competencia fisiológica de los espermatozoides y la integridad de su ADN. Por el contrario, si domina el lado antioxidante de la ecuación, se induce un estado de estrés reductor que también es perjudicial para la función de los espermatozoides. Un equilibrio redox es esencial si se quiere mantener la función normal de los espermatozoides.

## Referencias

1. Steptoe PC, Edwards RG, Walters DE. Observaciones sobre 767 embarazos clínicos y 500 nacimientos después de la fertilización *in vitro* humana.

Hum Reprod. 1986;1(2):89-94. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136366

2. Aitken RJ. Fertilización in vitro para la infertilidad masculina. *Acta Eur Fertil.* 1984;15(6):425-9..
3. Cohen J, Edwards R, Fehilly C, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, Rowland G, Steptoe P, Webster J. Fertilización in vitro: un tratamiento para la infertilidad masculina. *Esterilización fecunda.* 1985;43(3):422-32. doi: 10.1016/s0015-0282(16)48443-8.
4. Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF. Los efectos sobre la fertilización in vitro de autoanticuerpos contra espermatozoides en hombres subfértiles. *Hum Reprod.* 1993;8( 7):1079-82. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138196.
5. Pryor J, Parsons J, Goswamy R, Matson P, Vaid P, Wilson L, Whitehead M. Fertilización in vitro para hombres con azoospermia obstructiva. *Lanceta.* 1984;2(8405):762. doi: 10.1016/s0140-6736(84)92677-1.
6. Templeton AA, Mortimer D. Recuperación laparoscópica de espermatozoides en mujeres infértiles. *H. J Obstet Gynaecol.* 1980;87(12):1128-31. doi: 10.1111/j.1471-0528.1980.tb04485.x.
7. Aitken RJ, Best F, Richardson DW, Schats R, Simm G. Influencia de la cafeína en las características del movimiento, la capacidad de fertilización y la capacidad de penetrar el moco cervical de los espermatozoides humanos. *J Reprod Fertil.* 1983;67(1):19-27. doi: 10.1530/jrf.0.0670019
8. Mahaldashtian M, Khalili MA, Nottola SA, Woodward B, Macchiarelli G, Miglietta S. ¿La aplicación in vitro de pentoxifilina tiene efectos beneficiosos en la reproducción masculina asistida? *Andrología.* 2021;53(1):e13722. doi: 10.1111/y.13722.
9. Aitken RJ, Mattei A, Irvine S. Estimulación paradójica de la motilidad de los espermatozoides humanos por 2-desoxiadenosina. *J Reprod Fertil.* 1986;78(2):515-27. doi: 10.1530/jrf.0.0780515.
10. Aitken RJ, Clarkson JS. Importancia de las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes en la definición de la eficacia de las técnicas de preparación de espermatozoides. *J Androl.* 1988;9(6):367-76. doi: 10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x.
11. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Embarazos después de la inyección intracitoplasmática de un solo espermatozoide en un ovocito. *Lanceta.* 1992;340(8810):17-8. doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-f.
12. Esteves SC. Conceptos novedosos en infertilidad por factor masculino: perspectivas clínicas y de laboratorio. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(10):1319-1335. doi: 10.1007/s10815-016-0763-8.
13. He X, Cao Y, Zhang Z, Zhao J, Wei Z, Zhou P, Cong L. La espermatogénesis afecta el resultado de la ICSI para pacientes azoospermicos en lugar del método de recuperación de espermatozoides. *Syst Biol Reprod Med.* 2010;56(6):457-64. número: 10.3109/19396368.2010.513078.
14. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitución de la vía de especificación de células germinales de ratón en cultivo por células madre pluripotentes. *Celda.* 2011;146(4):519-32. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.052.
15. Ishikura Y, Ohta H, Sato T, Murase Y, Yabuta Y, Kojima Y, Yamashiro C, Nakamura T, Yamamoto T, Ogawa T, Saitou M. Reconstitución in vitro de

- todo el desarrollo de células germinales masculinas a partir de células madre pluripotentes de ratón. *Células madre*. 2021;28(12):2167-2179.e9. doi: 10.1016/j.stem.2021.08.005.
16. Zhang H, Zhang WW, Mo CY, Dong MD, Jia KT, Liu W, Yi MS. Producción de espermatozoides funcionales a partir de espermatogonia premeiótica cultivada in vitro en un pez marino. *Zool Res*. 2022;43(4):537-551. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.058.
  17. Bashiri Z, Gholipourmalekabadi M, Falak R, Amiri I, Asgari H, Chauhan NPS, Koruji M. Producción in vitro de espermatozoides morfológicos de ratón en testículos artificiales biodiseñados mediante impresión 3D de matriz extracelular. *Int J Biol Macromol*. 2022;217:824-841. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.127.
  18. Khampang S, Cho IK, Punyawai K, Gill B, Langmo JN, Nath S, Greeson KW, Symosko KM, Fowler KL, Tian S, Statz JP, Steves AN, Parnpai R, White MA, Hennebold JD, Orwig KE, Simerly CR, Schatten G, Easley CA 4º. Desarrollo de blastocistos después de la fertilización con espermátidas in vitro derivadas de células madre embrionarias de primates no humanos. *F S Sci*. 2021;2(4):365-375. doi: 10.1016/j.xfss.2021.09.001
  19. Masón KE. Conceptos cambiantes de la vitamina antiesterilidad (Vitamina E). *Yale J Biol Med*. 1942;14(6):605-618.1.
  20. Aitken RJ, Roman SD. Sistemas antioxidantes y estrés oxidativo en los testículos. *Oxid Med Cell Longev*. 2008;1(1):15-24. doi: 10.4161/oxim.1.1.6843.
  21. Di Renzo L, De Lorenzo A, Fontanari M, Gualtieri P, Monseñor D, Schifano G, Alfano V, Marchetti M; SIERR. Inmunonutrientes implicados en la regulación de los procesos inflamatorios y oxidativos: implicación para la competencia gameta. *J Assist Reprod Genet*. 2022;39(4):817-846. doi: 10.1007/s10815-022-02472-6.
  22. Gupta S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Capacidad antioxidante total- Relevancia, métodos e implicaciones clínicas. *Andrología*. 2021;53(2):e13624. doi: 10.1111/y.13624.
  23. Eroglu M, Sahin S, Durukan B, Ozakpinar OB, Erdinc N, Turkgeldi L, Sofuoglu K, Karateke A. Suero sanguíneo y selenio plasmático seminal, capacidad antioxidante total y niveles de coenzima q10 en relación con los parámetros del semen en hombres con infertilidad idiopática. *Biol Trace Elem Res*. 2014;159(1-3):46-51. doi: 10.1007/s12011-014-9978-7.
  24. Benedetti S, Tagliamonte MC, Catalani S, Primiterra M, Canestrari F, De Stefani S, Palini S, Bulletti C. Diferencias en el estado oxidativo de la sangre y el semen en hombres fértiles e infértiles, y su relación con la calidad del espermatozoide. *Reprod Biomed en línea*. 2012 ;25(3):300-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.05.011.
  25. Mostafa T, Anis T, El Nashar A, Imam H, Osman I. Plasma seminal reactivo especie de oxígeno-antioxidantes relación con el grado de varicocele. *Andrología*. 2012;44(1):66-9. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01111.x.
  26. Ni K, Steger K, Yang H, Wang H, Hu K, Zhang T, Chen B. Una investigación exhaustiva del daño del ADN de los espermatozoides y la lesión por estrés oxidativo en pacientes infértiles con varicocele clínico subclínico, normozoospermico y asteno/oligozoospermico. *Andrología*. 2016;4(5):816-24. doi: 10.1111/andr.12210.

27. Ammar O, Tekeya O, Hannachi I, Sallem A, Haouas Z, Mehdi M. Aumento de la fragmentación del ADN de los espermatozoides en hombres infértiles con varicocele: relación con la apoptosis, el estrés oxidativo seminal y los parámetros espermáticos. *Reprod Sci.* 2021;28(3):909-919. doi: 10.1007/s43032-020-00311-6.
28. Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Patrones dietéticos, alimentos y nutrientes en parámetros de fertilidad masculina y fecundabilidad: una revisión sistemática de estudios observacionales. *Actualización de Hum Reprod.* 2017;23(4):371-389. doi: 10.1093/humupd/dmx006.
29. Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Arora S, Arya DS, Talwar P, Sharma RK, Dada R. Niveles de antioxidantes en sangre y plasma seminal y su impacto en los parámetros de esperma en hombres infértiles. *Indio J Biochem Biophys.* 2010;47(1):38-43.
30. Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Mala calidad del semen y puntuaciones ROS-TAC en pacientes con infertilidad idiopática. *Urol Int.* 2008;81(3):263-70. doi: 10.1159/000151401.
31. de Ligny W, Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Jordan V, Fleischer K, de Bruin JP, Showell MG. Antioxidantes para la subfertilidad masculina. *Base de datos Cochrane Syst Rev.* 2022;5(5):CD007411. doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub5.
32. Aitken RJ. Tan cerca pero tan lejos. *F S Rep.* 2020;1(3):176. doi: 10.1016/j.xfre.2020.09.013.
33. Aitken RJ. Papel del daño del ADN de los espermatozoides en la creación de mutaciones de novo en la descendencia humana: la hipótesis de la "colusión de ovocitos post-meiótica". *Reprod Biomed en línea.* 2022a;45(1):109-124. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.03.012.
34. Yin H. Nuevas técnicas para detectar marcadores de estrés oxidativo: métodos basados en espectrometría de masas para detectar isoprostanos como el estándar de oro para el estrés oxidativo in vivo. *Biofactores.* 2008;34(2):109-24. doi: 10.1002/biof.5520340203.
35. Rafikov R, Rischard F, Vasilyev M, Varghese MV, Yuan JX, Desai AA, Garcia JGN, Rafikova O. Perfil de citoquinas en la hipertensión arterial pulmonar: el papel de la homeostasis redox y el sexo. *Transl Res.* 2022;247:1-18. doi: 10.1016/j.trsl.2022.03.013
36. Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, Majzoub A, Sabanegh E. Aplicación diagnóstica del ensayo de potencial de oxidación-reducción para la medición del estrés oxidativo: utilidad clínica en la infertilidad por factor masculino. *Reprod Biomed en línea.* 2017;34(1):48-57. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.10.008.
37. Henkel R, Morris A, Vogiatzi P, Saleh R, Sallam H, Boitrelle F, Garrido N, Arafa M, Gül M, Rambhatla A, Maldonado Rosas I, Agarwal A, Leisegang K, Siebert TI. Valor predictivo del análisis del potencial de oxidación-reducción seminal para los resultados reproductivos de la ICSI. *Reprod Biomed en línea.* 2022: S1472-6483(22)00359-5. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.05.010.
38. Joao F, Duval C, Bélanger MC, Lamoureux J, Xiao CW, Ates S, Benkhalifa M, Miron P. Reevaluando la interpretación del potencial de oxidación-reducción en la infertilidad masculina. *Reprod Fertil.* 2022;3(2):67-76. Doi: 10.1530/RAF-21-0005.



39. Gharagozloo P, Aitken RJ. El papel del estrés oxidativo de los espermatozoides en la infertilidad masculina y la importancia de la terapia antioxidante oral. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1628-40. doi: 10.1093/humrep/der132.
40. Sabeti P, Pourmasumi S, Fagheirelahee N. Efecto del selenio y la vitamina E en el nivel de espermatozoides HSPA2+, anión superóxido intracelular e integridad de la cromatina en la astenoteratozoospermia idiopática: un ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo. *Urol J.* 2021;18(5):549-555. doi: 10.22037/uj.v18i.6325.
41. Szymański M, Wandtke T, Wasilow K, Andryszczyk M, Janicki R, Domaracki P. Comparación de los resultados de 3 y 6 meses de la terapia oral combinada con fumarato de L-carnitina y acetil-L-carnitina, incluida en una formulación antioxidante, en pacientes con infertilidad idiopática. *Am J Mens Salud.* 2021;15(5):15579883211036790. doi: 10.1177/15579883211036790
42. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Impacto relativo del estrés oxidativo en la competencia funcional y la integridad genómica de los espermatozoides humanos. *Biol Reprod.* 1998;59(5):1037-46. doi: 10.1095/biolreprod59.5.1037
43. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Fumar y los bajos niveles de antioxidantes aumentan el daño oxidativo al ADN de los espermatozoides. *Mutat Res.* 1996 ;351(2):199-203. doi: 10.1016/0027-5107(95)00251-0.
44. Aitken RJ. La conferencia de Amoroso. El espermatozoide humano, ¿una célula en crisis? *J Reprod Fertil.* 1999;115(1):1-7. doi: 10.1530/jrf.0.1150001.
45. Beal MA, Yauk CL, Marchetti F. Del esperma a la descendencia: Evaluación de las consecuencias genéticas hereditarias del tabaquismo paterno y los posibles impactos en la salud pública. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;773:26-50. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.04.001
46. Barbonetti A, Castellini C, Di Giammarco N, Santilli G, Francavilla S, Francavilla F. La exposición in vitro de espermatozoides humanos al bisfenol A induce disfunción mitocondrial pro-oxidativa/apoptótica. *Reprod Toxicol.* 2016;66:61-67. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.09.014.
47. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Análisis de las relaciones entre estrés oxidativo, daño en el ADN y vitalidad espermática en una población de pacientes: desarrollo de criterios diagnósticos. *Hum Reprod.* 2010;25(10):2415-26. doi: 10.1093/humrep/deq214.
48. Vorilhon S, Brugnol F, Kocer A, Dollet S, Bourgne C, Berger M, Janny L, Pereira B, Aitken RJ, Moazamian A, Gharagozloo P, Drevet J, Pons-Rejraji H. Precisión de la cuantificación de la oxidación del ADN de los espermatozoides humanos y determinación del umbral utilizando un ensayo de inmunodetección 8-OHdG. *Hum Reprod.* 2018;33(4):553-562. doi: 10.1093/humrep/dey038.
49. Wang C, Lv H, Ling X, Li H, Diao F, Dai J, Du J, Chen T, Xi Q, Zhao Y, Zhou K, Xu B, Han X, Liu X, Peng M, Chen C, Tao S, Huang L, Liu C, Wen M, Jiang Y, Jiang T, Lu C, Wu W, Wu D, Chen M, Lin Y, Guo X, Huo R, Liu J, Ma H, Jin G, Xia Y, Sha J, Shen H, Hu Z. Asociación de tecnología de reproducción asistida, mutaciones de novo de la línea germinal y

- defectos cardíacos congénitos en un estudio prospectivo de cohorte de nacimiento. 2021;31(8):919-928. doi: 10.1038/s41422-021-00521-w.
50. Kreutzer DA, Essigmann JM. Las citosinas oxidadas y desaminadas son una fuente de transiciones C --> T in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3578-82. doi: 10.1073/pnas.95.7.3578
  51. Xavier MJ, Nixon B, Roman SD, Scott RJ, Drevet JR, Aitken RJ. Impactos paternos en el desarrollo: identificación de regiones genómicas vulnerables al daño oxidativo del ADN en espermatozoides humanos. *Hum Reprod*. 2019;34(10):1876-1890. doi: 10.1093/humrep/dez153.
  52. Bittel DC, Butler MG. Síndrome de Prader-Willi: genética clínica, citogenética y biología molecular. *Experto Rev Mol Med*. 2005;7(14):1-20. doi: 10.1017/S1462399405009531.
  53. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, Arima T. Asociación de cuatro trastornos de impronta y ART. *Epigenética de Clin*. 2019;11(1):21. doi: 10.1186/s13148-019-0623-3.
  54. Evenson DP, Djira G, Kasperson K, Christianson J. Las relaciones entre la edad de 25,445 hombres que asisten a clínicas de infertilidad y el ensayo de estructura de cromatina de esperma (SCSA®) definieron el ADN de los espermatozoides y la integridad de la cromatina. *Esterilización fecunda*. 2020;114(2):311-320. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.03.028.
  55. Vaughan DA, Tirado E, Garcia D, Datta V, Sakkas D. Fragmentación del ADN de los espermatozoides: un examen radical de la contribución del estrés oxidativo y la edad en 16 945 muestras de semen. *Hum Reprod*. 2020;35(10):2188-2196. doi: 10.1093/humrep/deaa159.
  56. Nago M, Arichi A, Omura N, Iwashita Y, Kawamura T, Yumura Y. El envejecimiento aumenta el estrés oxidativo en el semen. *Investig Clin Urol*. 2021;62(2):233-238. doi: 10.4111/icu.20200066.
  57. Kissin DM, Zhang Y, Boulet SL, Fountain C, Bearman P, Schieve L, Yeargin-Allsopp M, Jamieson DJ. Asociación del tratamiento de la tecnología de reproducción asistida (ART) y el diagnóstico de infertilidad parental con autismo en niños concebidos con ART. *Hum Reprod*. 2015;30(2):454-65. doi: 10.1093/humrep/deu338.
  58. Aitken RJ, Baker MA. El papel de la genética y el estrés oxidativo en la etiología de la infertilidad masculina, ¿una hipótesis unificadora? *Endocrinol frontal (Lausana)*. 2020;11:581838. doi: 10.3389/fendo.2020.581838.
  59. Punjani N, Kang C, Schlegel PN. Implicaciones clínicas de las microdeleciones del cromosoma Y entre hombres infértiles. *Mejor Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(6):101471. doi: 10.1016/j.beem.2020.101471
  60. Ting-Ting H, Xian-Ping D, Xia W, Jing R, Li-Yuan Z. Análisis de la microdelección del cromosoma Y en pacientes infértiles masculinos no obstructivos con azoospermia y oligozoospermia severa. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013;44(2):188-92.
  61. Sharma H, Sharma U, Kumar S, Kumar Singh S, Mohan S Mavaduru R, Prasad R. Prevalencia de microdelección del cromosoma Y en hombres infértiles del norte de la India con defecto de espermatogénesis. *J Genet*. 2021;100:39.
  62. Hammami W, Kilani O, Ben Khelifa M, Ayed W, Abdelhak S, Bouzouita A, Zhioua F, Amouri A. Prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y

- en hombres tunecinos infértiles. *Ann Biol Clin.* 2014;72(3):331-6. doi: 10.1684/abc.2014.0962.
63. Belva F, Bonduelle M, Roelants M, Michielsens D, Van Steirteghem A, Verheyen G, Tournaye H. Calidad del semen de crías ICSI adultas jóvenes: los primeros resultados. *Hum Reprod.* 2016;31(12):2811-2820. doi: 10.1093/humrep/dew245.
  64. Aitken RJ. *La trampa de la infertilidad.* Cambridge University Press, 2022b. doi:10.1017/9781108935593
  65. Luke B, Brown MB, Wantman E, Forestieri NE, Browne ML, Fisher SC, Yazdy MM, Ethen MK, Canfield MA, Watkins S, Nichols HB, Farland LV, Oehninger S, Doody KJ, Eisenberg ML, Baker VL. El riesgo de defectos de nacimiento con la concepción por ART. *Hum Reprod.* 2021;36(1):116-129. doi: 10.1093/humrep/deaa272.
  66. Aitken RJ, Gibb Z. Estrés oxidativo de los espermatozoides en el contexto de la infertilidad masculina: evidencia actual, vínculos con factores genéticos y epigenéticos y necesidades clínicas futuras. *Minerva Endocrinol.* 2022;47(1):38-57. doi: 10.23736/S2724-6507.21.03630-7.
  67. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Técnicas avanzadas de selección de espermatozoides para reproducción asistida. *Base de datos Cochrane Syst Rev.* 2019;7(7):CD010461. doi: 10.1002/14651858.CD010461.pub3.

*Traducido, Revisado y Editado por el Biol. Gerardo Cerezo Parra.*

# LA INICIATIVA DE SALUD REPRODUCTIVA MASCULINA (MRHI). HISTORIA Y MISIÓN

Christopher De Jonge

Director, Programa de Andrología, Centro Médico de la Universidad de Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA.

Autor Corresponsal: Dr. Christopher De Jonge. Correo electrónico: [Christopher.DeJonge@fairview.org](mailto:Christopher.DeJonge@fairview.org)

## Cápsula

La Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (**MRHI**) se formó en respuesta a la falta de conocimiento en la investigación, el lento progreso en nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas, y los datos alarmantes que asocian la salud reproductiva y somática.

## Introducción

El logro en 1978 del nacimiento de un bebé sano nacido después de la fecundación humana *in vitro* (FIV) revitalizó la investigación científica sobre la salud reproductiva masculina y, más específicamente, sobre la infertilidad masculina. Seguidamente, se hizo hincapié en utilizar los métodos estandarizados de análisis de semen de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para discriminar mejor entre hombres fértiles y subfértiles. Además, se desarrollaron pruebas de la función de los espermatozoides que contribuyen a la fecundación para proporcionar datos adjuntos a los resultados del análisis de semen, por ejemplo, ensayos de penetración de espermatozoides de las envolturas del ovocito, la cinemática y la capacitación de espermatozoides. Luego, en 1992, nació el primer bebé nacido de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Esta técnica ayudó a transformar el campo de la FIV que hasta ese momento había tenido solo un mínimo de éxito en casos de factor masculino significativo o no diagnosticado, por ejemplo, oligoastenoteratozoospermia, obstrucción de los conductos deferentes. Hoy en día, estos avances son una parte integral de la reproducción médicamente asistida (MAR, del inglés *medically assisted reproduction*) y han brindado a millones de personas en todo el mundo la posibilidad de realizar su sueño de formar una familia.

Hoy en día, MAR es una industria global de más de \$30 mil millones de dólares y está creciendo a más de \$50 mil millones de dólares en menos de 10 años. Junto con este desarrollo histórico sobrevienen algunas preocupaciones, como el uso generalizado de ICSI para condiciones de factor no masculino y el declive de la investigación de función espermática translacional, la desaparición de la mayoría de las pruebas de función espermática y una aparente indiferencia hacia el análisis de semen tradicional, a lo que se suma un adagio de 'por qué hacer un análisis de semen cuando solo necesitamos unos pocos espermatozoides para ICSI'. Es importante mencionar al principio de este capítulo que, debido a que los diagnósticos y tratamientos para la infertilidad por factor masculino son insuficientes, se ha colocado erróneamente una carga significativa sobre las mujeres como sustitutas para el "tratamiento" de los casos de infertilidad por factor masculino y no masculino.

El propósito de este capítulo es presentar la Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (**MRHI**) a través de una revisión histórica, y 1) la base para su formación, a la que se ha aludido anteriormente, 2) su misión y metas, y 3) logros y direcciones futuras.

## MRHI – Una llamada de atención para la acción

En 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) encargó a un grupo de expertos que analizara la base de datos bibliográfica sobre el diagnóstico de la infertilidad masculina con el fin de desarrollar pautas integrales. Se utilizó el sistema GRADE para evaluar la calidad de la evidencia y para hacer recomendaciones para las preguntas priorizadas con respecto al diagnóstico de infertilidad masculina. La publicación resultante (1) que detalla el resultado después de analizar la literatura no fue alentadora. Una de las preguntas prioritarias formuladas fue "¿Cuál es la prevalencia de la infertilidad masculina y qué proporción de infertilidad es atribuible al varón?". Luego del análisis de la evidencia, se llegó a la conclusión de que no era posible determinar la prevalencia imparcial de la infertilidad masculina en la población general debido a que la calidad de la evidencia fue muy baja. Este hallazgo es asombroso, especialmente dado que han pasado más de 30 años desde el advenimiento de la FIV y 20 años desde que se desarrolló la ICSI. Retrospectivamente preocupante, el consentimiento informado se proporcionó a nivel mundial a cientos de miles de pacientes con respecto a la prevalencia y la contribución de la infertilidad masculina, pero sin tener datos basados en evidencia.

Una segunda pregunta clave que se hizo fue "¿Cuál es el valor clínico de los parámetros tradicionales del semen?". Una simple pregunta que muchas personas habrían pensado que la respuesta era comúnmente conocida. El análisis resumido mostró que la fuerza de la evidencia era alta para 1) la combinación de varios parámetros de semen es un mejor predictor de fertilidad que un solo parámetro, y 2) un solo análisis de semen es suficiente para la mayoría de las decisiones clínicas y, si un parámetro es anormal, es apropiado repetir el análisis de semen. Si bien estos resultados parecen favorables, el panel expresó una necesidad urgente de llenar los vacíos en el conocimiento científico que se descubrieron con respecto a la formación, maduración y fisiología de los espermatozoides tanto normales como disfuncionales. Esta recomendación se hizo 60 años después de los descubrimientos revolucionarios de Austin y Chang, quienes publicaron evidencia del requisito de capacitación en la fertilización de mamíferos. Resulta más que un poco decepcionante que, incluso hoy en día, todavía existen lagunas críticas en nuestro conocimiento sobre el funcionamiento del espermatozoide humano.

Las inquietantes realidades resultantes de la investigación del panel de expertos de la OMS estimularon un amplio debate entre los líderes de opinión clave (KOL, del inglés *Key Opinion Leaders*) en el campo, en particular los profesores Richard Sharpe, Christopher Barratt y Christopher De Jonge. La culminación de estas discusiones se formalizó en una publicación titulada "*Man Up*": la importancia y la estrategia para colocar la salud reproductiva masculina en el centro de la agenda política y de investigación" (2). En el documento, los autores plantearon preguntas con respecto a 1) el problema de salud global de la disminución del conteo de espermatozoides y sin evidencia clara de causas conocidas, 2) la observación de una falta sustancial en el progreso para responder preguntas fundamentales (brechas) en andrología, y 3) la desaparición virtual de los ensayos de función espermática como complemento del análisis de semen, y con pocos ensayos nuevos probados rigurosamente para llenar el vacío. La combinación de estas preguntas arrojó luz sobre un aumento global rápido y conspicuo en el uso de la ICSI para la infertilidad por factores no masculinos. Colectivamente, estas preocupaciones estimularon la necesidad de formular una "hoja de ruta de la salud reproductiva masculina" que identificaría de manera integral las limitaciones en la investigación y reclutaría, como socios, a las diversas partes interesadas, por ejemplo, científicos, organismos de financiación encargados de formular políticas, etc., necesarios para impulsar el(los) cambio(s) que podría tener un impacto positivo en las agencias de financiación y los responsables de la asignación de fondos. Una conclusión general del documento es que la conciencia sobre la salud reproductiva masculina (MRH, del inglés *Male Reproductive Health*) debe hacerse más visible no solo dentro de las comunidades científica y médica, sino también en la sociedad. Por ejemplo, se espera que al empoderar a los hombres con información sobre salud reproductiva y la asociación con la salud en general, los movilizará para participar más regularmente en la atención médica. Además, con el desarrollo de nuevas pruebas y tratamientos para la infertilidad masculina, se anticipa que se aliviará la carga que las mujeres soportan actualmente para el tratamiento de la infertilidad masculina. Finalmente, se anticipa que un resultado positivo de una hoja de ruta de salud reproductiva masculina completamente ejecutada ofrecerá beneficios socioeconómicos a la sociedad.

Si bien las publicaciones impactantes y las voces movilizadoras dentro del campo de la salud reproductiva masculina son un punto de partida para el cambio, ejecutar completamente la hoja de ruta requiere un "llamado a las armas" (por la frase en inglés "*Call to arms*") dentro y más allá de la disciplina, para incluir a un amplio espectro de partes interesadas y, en última instancia, para

estimular la respuesta de los hombres, sus parejas y las comunidades, porque para lograr el progreso necesario se requiere la participación y el esfuerzo de muchos.

En el año 2019, se presentó la oportunidad de anunciar un "llamado a las armas" en colaboración con la *American Society of Andrology* (Sociedad Estadounidense de Andrología; ASA), que se estaba preparando para convocar su reunión anual. El profesor Barratt y yo nos comunicamos con el Consejo Ejecutivo de la ASA y ofrecimos la propuesta de que la ASA considere apoyar un taller titulado "La crisis en la salud reproductiva masculina (MRHI): la necesidad de una hoja de ruta política, social y de investigación". El objetivo declarado del taller fue formular estrategias específicas para abordar los problemas que actualmente faltan o no se abordan pero que son vitales para el hombre sano. Para lograr el objetivo por completo, se requirió la participación de una variedad de partes interesadas, incluidos científicos, médicos, *Andrology Australia/Healthy Male* (grupo predicador de apoyo/educación de la salud reproductiva masculina), *Resolve* (grupo de apoyo para pacientes), NICHHD (agencia de financiación), la industria y la *Male Contraceptive Initiative* (organización sin fines de lucro). ASA fue un apoyo abrumador; proporcionaron un comunicado de prensa anunciando el evento e hicieron posible la participación virtual global. El taller fue un gran éxito y sirvió para atraer a más KOL para formar posteriormente el Grupo de Trabajo MRHI (ver agradecimientos). Es importante mencionar que otra consecuencia del taller fue que otras sociedades profesionales se dieron cuenta y amablemente extendieron invitaciones para correr la voz sobre el MRHI en sus reuniones anuales. Su apoyo resultó ser invaluable.

Fue en ese momento que se publicó un artículo impactante para crear conciencia sobre la salud reproductiva masculina (3). El título advertía sobre una "...crisis actual en la salud reproductiva masculina..." y el artículo hacía referencia a datos emergentes y preocupantes sobre la salud reproductiva masculina, su relación con la salud somática y las condiciones hereditarias que un padre puede transmitir a su descendencia. Estos datos preocupantes llevaron a la contundente conclusión de que deben ocurrir los cambios necesarios en las políticas públicas y en la educación, la investigación básica y clínica, y en el financiamiento necesario para apoyar la implementación de las mismas. También fue en esta publicación que se anunció formalmente la formación del MRHI junto con los objetivos del grupo, que son "crear la conciencia de la sociedad, las agencias políticas y de financiación, y otros, sobre (i) la importancia de la salud reproductiva masculina, (ii) la conexión con la salud y la enfermedad general del hombre, (iii) el papel que tiene el hombre en la salud y el bienestar de su descendencia y la próxima generación, y (iv) ayudar a aliviar la carga significativa que actualmente soporta su pareja femenina cuando busca diagnóstico y tratamiento de la infertilidad". El documento concluyó con la advertencia de que "si no se toman medidas rápidamente, los hombres seguirán muriendo más jóvenes, sufrirán más tiempo con enfermedades crónicas y, sin saberlo, seguirán transmitiendo sus firmas genómicas y epigenómicas potencialmente alteradas a las generaciones futuras. ¡La salud de los hombres es la salud de la comunidad mundial!" De hecho, la salud del hombre es la salud de la mujer y la salud de la familia.

Con el anuncio formal de MRHI, se hizo imperativo que se desarrollara una declaración de misión para informar a las partes interesadas sobre su propósito, intención general y dirección. La misión de la **Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina (MRHI)** es una colaboración global dedicada al avance de la ciencia y la práctica de la medicina reproductiva masculina. El MRHI cumple su misión 1) promoviendo y contribuyendo a la investigación de alta calidad tanto en ciencia básica como clínica, 2) forjando relaciones de colaboración con sociedades profesionales para contribuir a una misión de educación, y 3) abogando desde el MRHI ante todas las partes interesadas, incluido el apoyo al paciente grupos, agencias de financiación, organizaciones sin fines de lucro, la industria y el público. Los objetivos del MRHI son aumentar la conciencia de la sociedad, las agencias de políticas y de financiamiento y otros sobre 1) la importancia de MRH, 2) la conexión con la salud y la enfermedad masculina en general, 3) el papel que tiene el hombre en la salud y bienestar de su descendencia y la próxima generación, y 4) Ayudar a aliviar la carga significativa que actualmente lleva la pareja femenina cuando busca un diagnóstico y tratamiento para la infertilidad.

Como se mencionó anteriormente, se formó un grupo de trabajo de MRHI que incluía KOL de ciencias básicas y clínicas y grupos de defensa de pacientes. El primer acto colectivo del grupo fue publicar un artículo de opinión para aclarar los objetivos de la hoja de ruta de la salud reproductiva masculina (4). Una pregunta crítica planteada fue "¿Cuáles son las preguntas de investigación importantes y sensibles al tiempo?". Si bien algunas de las preguntas se introdujeron anteriormente en este capítulo, se identificó en el documento que era necesario profundizar más

para abarcar la totalidad del campo. Al momento de escribir este capítulo, se está enviando un manuscrito para su publicación que detalla 13 preguntas de investigación sensibles al tiempo que identifican brechas clave en el conocimiento científico sobre la salud reproductiva masculina. Para llevar a cabo la investigación necesaria, se planteó una pregunta crucial sobre los modelos experimentales óptimos, independientemente de la especie, que pudieran generar más rápidamente los datos más relevantes. En última instancia, el documento reforzó que la política, las sociedades profesionales y las agencias de financiación son socios fundamentales para la colaboración para optimizar el éxito de los esfuerzos de investigación, y que la sociedad es integral porque identificar y satisfacer las necesidades de la sociedad es el objetivo de resultado general.

## **Salud reproductiva masculina - Financiamiento de la investigación y socioeconomía**

Como se mencionó anteriormente, surgieron preguntas sobre las vacancias en el conocimiento y la financiación de la investigación. Específicamente, si podría haber una relación de causa y efecto por la que los niveles de financiación de la investigación estuvieran por debajo del apoyo a la investigación translacional y clínica en la salud reproductiva masculina. Una de las razones para hacer la pregunta provino de investigar el total de dólares gastados por el gobierno nacional en toda la investigación médica per cápita y la cantidad que se distribuyó posteriormente para la investigación de la salud reproductiva masculina per cápita en Australia, EE.UU., Reino Unido y Alemania (Tabla 1 en referencia 4). Australia asignó el 0,3% del total de dólares de investigación *per capita* para financiar la investigación de la salud reproductiva masculina y EE.UU. asignó la mayor cantidad con un 3%. Los datos son notables, especialmente considerando lo siguiente: 1) la infertilidad está clasificada como una enfermedad por la Asociación Médica Americana, la Organización Mundial de la Salud y otras agencias, 2) la frecuencia global con la que la enfermedad afecta a parejas en edad reproductiva que desean un bebé es estimado entre 14-17%, y 3) existe una asociación entre la infertilidad masculina y la salud somática, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos. Por lo tanto, un gran porcentaje de la población mundial sufre de infertilidad, sin embargo, la cantidad gastada por los gobiernos para aprender más sobre la enfermedad parece palidecer en comparación con otros estados de enfermedad.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se realizó una investigación más profunda para examinar específicamente la financiación del Reino Unido y los EE. UU. más de cerca para la salud reproductiva masculina y la infertilidad (5). Sorprendentemente, esta publicación fue el primer informe comparativo de financiamiento gubernamental para la investigación sobre la infertilidad y la salud reproductiva de hombres y mujeres. Las conclusiones resultantes fueron confirmatorias y alarmantes. En primer lugar, si bien la infertilidad masculina representa un riesgo mundial para la salud de muchos millones de hombres, la financiación de la investigación para desarrollar mejores herramientas de diagnóstico y regímenes de tratamiento no se encuentra en un nivel adecuado. En segundo lugar, la financiación de la investigación sobre la reproducción masculina y femenina está muy por debajo de lo que se esperaría dada la clasificación de la infertilidad como una enfermedad y la frecuencia con la que las mujeres y los hombres son afectados y tratados por infertilidad, y el posible impacto socioeconómico en la sociedad.

Como se hizo mención previamente en este documento, la sociedad es un actor clave para impulsar el éxito de la hoja de ruta de la salud reproductiva masculina. Dada la relativa escasez de fondos asignados a la investigación de salud reproductiva masculina y la falta de nuevas pruebas diagnósticas y terapias, surgió la pregunta de si la infertilidad masculina como enfermedad tiene un impacto socioeconómico (6). En este capítulo, se ha hecho mención de una asociación entre salud reproductiva masculina y trastornos de salud somáticos, como enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Además, dado que existe una línea de tendencia de parejas que forman familias más tarde en la vida, existe una asociación entre la edad paterna avanzada y 1) trastornos espectrales, por ejemplo, autismo y esquizofrenia, 2) trastornos epigenéticos transmitidos paternamente a la descendencia y 3) periparto complicaciones maternas, por ejemplo, preeclampsia (por ejemplo, 3,7,8). El año de vida ajustado por discapacidad (AVAD) es una medida de la carga de enfermedad general, expresada como el número de años perdidos debido a problemas de salud, discapacidad o muerte prematura. Sorprendentemente, no hay datos de DALY con respecto a ninguno de los problemas de salud del hombre, su pareja femenina o la descendencia nacida. Además, las bases de datos impactantes, como *Pew Charitable Trust*, Eurostat, CDC, carecen notablemente de información completa sobre los hombres, la salud reproductiva y la fertilidad. En conclusión, el impacto socioeconómico que podría resultar de los hombres que sufren de infertilidad no está claro en la actualidad. La consecuencia es que las políticas sociales y las disposiciones de atención de

la salud, por ejemplo, los seguros y la financiación de la investigación para mejorar las pruebas de diagnóstico y los tratamientos terapéuticos, siguen arraigadas como el statu quo a pesar de que la evidencia demuestra que los hombres mueren más jóvenes y viven más tiempo con enfermedades que sus contrapartes femeninas. y la preocupante relación entre salud reproductiva y somática.

## Los hombres y su infertilidad

Numerosos datos de la literatura informan que los hombres suelen participar mucho menos en la búsqueda de atención médica que las mujeres (p. ej., 3, 9). Cabe destacar que requiere una condición aguda que obligará a una visita al médico. La adherencia a las normas tradicionales de género sobre masculinidad y los temores de una afección médica grave sospechosa o desconocida son factores que influyen en los hombres para buscar atención médica de manera irregular. En consecuencia, la mayor parte de la toma de decisiones sobre el cuidado de la salud de la familia recae en la mujer. Sorprendentemente, se sabe muy poco sobre las actitudes de los hombres sobre la búsqueda de atención médica para la infertilidad. La mayor parte de la información se refiere a los sentimientos y actitudes de los hombres mientras se someten a la investigación y el tratamiento de MAR. Una sensación general de estos informes es que los hombres tienden a sentirse "excluidos" de la conversación sobre la infertilidad; sentir que el proceso está centrado en la mujer y que el papel del hombre está subordinado a servir solo como fuente de ADN. Por lo tanto, se hizo la pregunta "¿Cómo se sienten los hombres acerca de su infertilidad"? La respuesta a esta pregunta aparentemente obvia no se ha planteado previamente.

Además de esta pregunta, se formularon otras preguntas que culminaron en un cuestionario anónimo dirigido a hombres infértiles de 6 preguntas que se distribuyó a nivel mundial a través del sitio web de *Fertility Europe* (9), una organización que representa a las asociaciones de pacientes en el campo de la infertilidad en más de 20 naciones europeas. Este fue el primer estudio a gran escala y culturalmente diverso que informó específicamente sobre cómo se sienten los hombres acerca de su infertilidad y su disposición a hablar al respecto, qué los motivó a buscar atención médica y qué recursos utilizan para aprender sobre su condición. El objetivo era que, al aprender las respuestas a estas preguntas, pudiera arrojar luz sobre cómo pueden sentirse más comprometidos individualmente y en colaboración con su pareja a lo largo del viaje MAR. Una forma necesaria de lograr este objetivo es comprender cuáles son las necesidades emocionales y prácticas de los hombres, que a su vez les permiten compartir sus sentimientos. Además, este estudio enfatizó la importancia de que los hombres sean más abiertos y compartan sus sentimientos con su pareja, familia, amigos y grupos de apoyo, y al hacerlo se sentirán empoderados, lo que resultará en una mentalidad emocional más positiva y, en consecuencia, estar en una mejor posición de apoyo para su pareja.

## Conclusiones

La **Iniciativa de Salud Reproductiva Masculina MRHI** surgió debido a la rápida acumulación de evidencia de que el campo de la salud reproductiva masculina estaba desatendido, como lo sugiere una disminución en la investigación traslacional y clínica en el área, datos que reflejan disminuciones globales en el conteo de espermatozoides y datos emergentes de una asociación entre salud somática y reproductiva, y algunas de las consecuencias negativas de esa asociación se transmiten potencialmente a la descendencia.

Al generar conciencia sobre las brechas de conocimiento en MRH, el **MRHI** espera estimular a los formuladores de políticas para que realicen cambios transformadores para aumentar el apoyo financiero para la investigación de la salud reproductiva masculina, lo que resultará en mejores pruebas de diagnóstico y mejores estrategias terapéuticas que, en última instancia, conducirán a una reducción de la carga que actualmente soportan las mujeres. como sustitutos de la infertilidad masculina. Además, **MRHI** tiene la intención de desarrollar recursos educativos que aborden las necesidades de los hombres para que tengan más probabilidades de participar activamente en la búsqueda de atención médica de MRH. El éxito de esta meta educativa tendrá un impacto positivo no solo para el hombre que lucha contra la infertilidad sino también si su pareja sufre de infertilidad porque se sentirá más cómodo para expresar abiertamente sus sentimientos y brindará más apoyo emocional a su pareja a lo largo de este viaje MAR.

## Agradecimientos



El grupo de trabajo de MRHI está formado por científicos, médicos y líderes de grupos de apoyo para pacientes dedicados y apasionados, y son: Richard Anderson (Reino Unido), Christopher Barratt (Reino Unido), Christopher De Jonge (EEUU), Michael Eisenberg (EEUU), Nicolas Garrido (España), Sarah Kimmins (Canadá), Csilla Krausz (Italia), Moira O'Bryan (Australia), Allan Pacey (Reino Unido), Satu Rautakallio-Hokkanen (Finlandia), Frank Tuttleman (Alemania), Mónica Vazquez-Levin (Argentina), Joris Veltman (Reino Unido).

## Referencias

1. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Martini FO, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance - Challenges and future research opportunities. *Human Reprod Update*. 2017; 23:660-680.
2. Barratt CLR, De Jonge CJ, Sharpe RM. 'Man Up': the importance and strategy for placing male reproductive health centre stage in the political and research agenda. *Human Reprod* 2018; 33:541-5.
3. De Jonge C, Barratt CLR. The present crisis in male reproductive health: an urgent need for a political, social, and research roadmap. *Andrology* 2019; 7:762-8.
4. Barratt CLR\*, De Jonge CJ\*, Anderson RA, Eisenberg ML, Garrido N, Rautakallio Hokkanen S, Krausz C, Kimmins S, O'Bryan MK, Pacey AA, Tuttelman F, Veltman JA. A global approach to addressing the policy, research and social challenges of male reproductive health. *Human Reprod Open*, 2021; 1: hoab009. \*Co-lead authors.
5. Gumerova E, De Jonge CJ and Barratt CLR. Research Funding for Male Reproductive Health and Infertility in the UK and USA [2016 - 2019]. *Human Fertility* 2022; 18:1-11. doi: 10.1080/14647273.2022.2045521.
6. De Jonge CJ, Barratt CLR, Pacey AA. Counting the hidden costs of male reproductive health. *World J Mens Health*. 2022; 40:344-345.
7. Barratt CL, Anderson RA, De Jonge C. Male fertility: a window on the health of this generation and the next. *Reprod Biomed Online*. 2019; 39:721-723.
8. Eisenberg ML, Barratt CLR, De Jonge CJ. Don't forget the father. *Fertil Steril*. 2022; 117:936-937.
9. De Jonge CJ, Gellatly SA, Vazquez-Levin MH, Barratt CLR, Rautakallio-Hokkanen S. Male Attitudes Towards Infertility – Results From A Global Questionnaire. *World J Mens Health*. In press. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220099>

*Traducido, revisado y editado por la Dra. Vazquez-Levin.*

---

[1] La Organización Mundial de la Salud emitió en Julio 2021 la 6ta Edición del Manual de Procesamiento del Semen.

[2] (chrome extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fncchs%2Fdata%2Fvsrr%2Fvsrr012-

[508.pdf&clen=400595&chunk=true](#)

[3] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>)

[4] (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen)

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>

Para comentarios, correcciones, sugerencias o dudas, favor de escribir a [yaonox@gmail.com](mailto:yaonox@gmail.com)

La fertilidad del varón es un tema de gran importancia. Alrededor del mundo, el varón causa aproximadamente la mitad de la infertilidad, pero hasta recientemente se ha prestado menos atención a este tema. Afortunadamente, esto está cambiando rápidamente. Este libro es una gran adición en la biblioteca de los doctores y científicos de habla hispana quienes cuidan y estudian la Salud Reproductiva Masculina. Los 30 capítulos del libro titulado **Salud Reproductiva Masculina**, tienen las asignaturas más importantes en el área y han sido escritas por autores referentes en el mundo en las diversas temáticas. Las materias fundamentales están tratadas, así como otras también, ¡por ejemplo micro-robots!. El libro es muy útil, manejable y lo recomiendo a todos con interés en Salud Reproductiva Masculina.



**Craig Niederberger MD FACS**  
*Clarence C. Saelhof Professor and  
Head, Department of Urology,  
UIC College of Medicine  
Professor, Department of Bioengi-  
neering, UIC College of Engineering*

**ISBN**

**978-607-99997-1-1**