



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía (Urología)

DOCTORADO EN CIRUGÍA Y CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Tesis doctoral

**“ EFECTO DE LA MICROVARICOCELECTOMÍA Y EL
TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE ORAL EN EL ADN ESPERMÁTICO
EN PACIENTES INFÉRTILES CON VARICOCELE ”**

Presentada por: **D. Josep Gual Frau**

Tutor y Director: **Dr. D. Salvador Navarro Soto**

Directores: **Dr. D. Joan Prats López**

Dr. D. Agustín García Peiró

Sabadell, noviembre de 2019



Dr. Salvador Navarro Soto, Profesor agregado de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) del departamento de Cirugía.

Dr. Joan Prats López, Profesor Asociado de la UAB del departamento de Cirugía.

Dr. Agustín García Peiró, Doctor en Biología celular por la UAB.

CERTIFICAN

Que el Sr Josep Gual Frau ha realizado bajo su dirección, en el departamento de Cirugía y Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la UAB, el trabajo:

**“ EFECTO DE LA MICROVARICOCELECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO
ANTIOXIDANTE ORAL EN EL ADN ESPERMÁTICO EN PACIENTES
INFÉRTILES CON VARICOCELE ”**

Para poder optar al título de Doctor en Medicina por la UAB.

Salvador Navarro Soto

Joan Prats López

Agustín García Peiró

Sabadell, noviembre de 2019

A na María, n'Aina i na Núria.

Perquè gracis a voltros som lo que som,

Moltssimes gracis!

A mis padres

“ Para llegar a la excelencia hay que formarse, para traspasarla hay que transformarse ”

Xesco Espar - Jugar con el corazón

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a las personas que han colaborado a la realización de esta tesis doctoral. En primer lugar, a los directores de la misma, Agustín García Peiró, Joan Prats López y Salvador Navarro Soto por darme su confianza y la oportunidad de realizar este trabajo, del cual, el tiempo y la distancia han querido dificultar su ejecución, pero la amistad y la fuerza de voluntad han llevado a su fin. Gracias Joan por implicarte tanto, ayudarme y encontrar siempre un momento para uno de tus “niños”, para que juntos lleguemos a decir orgullosos que lo hemos conseguido. De manera especial, agradecer al equipo de CIMAB y a su Fundador y Director, el Dr Agustín García Peiró, por su ayuda muchas veces desinteresada y sin la cual, este proyecto seguro que no hubiera llegado a buen puerto.

De la misma manera, agradecer a todos mis compañeros y amigos del servicio de Urología del Parc Taulí, en especial a Carlos Abad y Naim Hannaoui por confiar en mí y darme el mayor de los apoyos, infinitos consejos y una amistad paternal increíble. También a Jesús Muñoz por ser mi compañero de viaje en muchos aspectos. En más o menos medida, todos habéis contribuido a hacer posible esta tesis doctoral, la cual está hecha gracias a vosotros y de todo corazón os quiero dedicar.

Me gustaría agradecer el apoyo y la ayuda para realizar esta tesis, así como aguantarme en mi peor época a mis compañeros del servicio de Urología del Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva, especialmente al Dr. Victor Gonzalvo por hacer tan fáciles las cosas y por ser un ejemplo y un amigo en estos últimos años.

Quiero agradecer a mi familia su apoyo incondicional. A mis padres, Pep y Gari, por su dedicación total a que yo pudiera llegar a ser médico y creer en mí cuando prácticamente no creía ni yo. Si soy quien soy y he llegado donde he llegado, es gracias a vosotros. A mi hermano Mateu, por ser la pieza más importante en mi educación, ser un ejemplo siempre y una ayuda cuando ha sido necesario. A mi hermana Marga, mi amiga y profesora, aquella persona que sabe cómo me siento sin contárselo, y que es un apoyo esencial para mí. A mis “otros padres”, Jaime y Pili, por tratarme como un hijo, y por ser de una ayuda impagable para poder finalizar esta tesis doctoral. Al resto de mi familia de Mallorca por creer en mí y

demostrarme tanto cuando realmente hace falta. A mi familia de Aiacor, por ser un apoyo tan necesario para encontrar esos momentos que parecían imposibles para escribir esta tesis.

No quisiera dejar pasar la oportunidad de agradecer y de dedicar esta tesis a mis abuelos que tanto significaron en mi vida y gracias a los cuales, y no tengo ninguna duda de que han colaborado mucho, he llegado donde he llegado.

No podría terminar sin agradecer especialmente a Maria y a mis hijas, Aina y Núria, su apoyo, sus sonrisas, sus abrazos y su cariño que hace posible que saque fuerzas para haber realizado esta tesis y, porque gracias a vosotras soy lo que soy. Cuantísimas veces agradeceré haber hecho este camino a vuestro lado, sobre todo a tu lado, Maria, compartiendo tantos momentos cara al ordenador, trasnochando, durmiendo mal, pero siempre con una sonrisa gracias a vosotras, porque por y con vosotras, todo vale la pena. Vos estim molt!

Gracias a todos de todo corazón.

Josep Gual Frau, noviembre de 2019.

ABREVIATURAS

- ▶ ADN: Ácido Desoxiribonucleico.
- ▶ UAB: Universitat Autònoma de Barcelona.
- ▶ OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ▶ LH: Hormona luteínica (del inglés *Luteinic Hormone*).
- ▶ FSH: Hormona Folículo estimulante (del inglés *Follicular Stimulate Hormone*).
- ▶ HIF-1-alfa: factor 1-alfa inducible por hipoxia.
- ▶ SCA: *Sperm Class Analyzer*.
- ▶ VEI: Vena Espermática Interna.
- ▶ HCG: Hormona Gonadotropina Coriónica humana (de las siglas en inglés).
- ▶ ICSI: *IntraCytoplasmatic Sperm Injection*.
- ▶ ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.
- ▶ ATP: Adenosin Trifosfato (de las siglas en inglés).
- ▶ 8-OHdG: 8-hidroxi-desoxiguanosina.
- ▶ FIV: Fecundación *In Vitro*.
- ▶ TRA: Técnica de Reproducción Asistida.
- ▶ TAA: Actividad antioxidante total (de las siglas en inglés).
- ▶ LDL: *Low Density Lipids*.
- ▶ PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (de las siglas en inglés).
- ▶ ALA: Ácido α -linolénico (de las siglas en inglés).
- ▶ DHA: Ácido decosahexanoico (de las siglas en inglés).

- ▶ EPA: Ácido eicosapentanoico.
- ▶ CIMAB: Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona.
- ▶ CEIC: Comité Ético de investigación Clínica.
- ▶ PBS: Tampón salino fosfato (de las siglas en inglés).
- ▶ TBE: Tris-Borato-EDTA.
- ▶ MV: Microvaricoclectomía.
- ▶ FADN: Fragmentación de ADN espermático.
- ▶ DADN: Degradación de ADN espermático.
- ▶ IF: Intensidad de fluorescencia.
- ▶ FITC: Iso-Tio Cianato de Fluoresceína (de las siglas en inglés).
- ▶ LT: longitud telomérica.
- ▶ Kb: Kilobases.
- ▶ SCD: Dispersión de la cromatina espermática (de las siglas en inglés).

RESUMEN DE LA TESIS

Introducción

El varicocele es una de las mayores causas de infertilidad masculina. El tratamiento quirúrgico del varicocele está indicado en pacientes con infertilidad y varicocele clínico o palpable. La microcirugía del varicocele ha demostrado ser la mejor técnica para su reparación.

El varicocele grado I o subclínico, en el que no se recomienda el tratamiento quirúrgico, también puede ser causa de infertilidad. El tratamiento antioxidante ha demostrado mejorías en la calidad seminal de pacientes infértiles, pero no hay datos de su efecto en pacientes con varicocele.

Las especies reactivas de oxígeno que se generan en aumento en pacientes con varicocele, pueden dañar el ADN espermático, principalmente a través de modificaciones en la guanina. En nuestro grupo, postulamos que el efecto de daño en el ADN podía ser más intenso en los telómeros, dado que los telómeros son ricos en guanina, hecho que podría comprometer la fertilidad.

Hipótesis y Objetivos

Conociendo las anteriores afirmaciones, se ha intentado analizar por un lado el efecto de la microvaricocelectomía sobre la longitud telomérica y fragmentación del ADN espermático, así como su efecto el seminograma; y por otro lado, en aquellos pacientes con varicocele subclínico, se ha intentado comprobar el efecto del tratamiento antioxidante tanto en el seminograma como en la fragmentación del ADN espermático.

Material y Métodos

Se han incluido en el estudio 12 donantes de semen fértiles y 40 pacientes con varicocele asociado a infertilidad y se han dividido en 2 grupos.

- ▶ Grupo 1: 20 pacientes con varicocele clínico, en los cuales se ha analizado antes y 9 meses después del tratamiento quirúrgico mediante microvaricocelectomía, los

- ▶ valores del seminograma, la fragmentación de simple y doble cadena y la longitud telomérica del ADN espermático.
- ▶ Grupo 2: 20 pacientes con varicocele subclínico, en los cuales se ha analizado antes y 3 meses después del tratamiento antioxidante oral mediante un complejo multivitamínico, los valores del seminograma y la fragmentación de ADN espermático.

Resultados

En comparación a donantes fértiles, el varicocele no tiene una reducción significativa de la longitud telomérica. Respecto a la microvaricocelectomía, tampoco ha demostrado cambios en dicha longitud. Sin embargo, sí se han observado cambios estadísticamente significativos en cuanto a los valores del seminograma y de la fragmentación de ADN espermático, tanto de simple como de doble cadena.

En cuanto al tratamiento antioxidante en los pacientes con varicocele subclínico, ha demostrado una reducción significativa de la fragmentación del ADN espermático, mientras que en el seminograma, solamente se observaron cambios a favor del tratamiento en el número total de espermatozoides, sin que se vieran alterados el resto de valores del seminograma.

Conclusiones

En base a nuestros resultados, podemos afirmar que en nuestra serie no hemos encontrado un efecto del varicocele y de su tratamiento quirúrgico sobre la longitud telomérica del ADN espermático. Sí que hemos confirmado la mejoría en las cifras de fragmentación del ADN espermático de simple y doble cadena y mejorías en el seminograma gracias al tratamiento.

Por otro lado, los datos sugieren que la integridad del ADN espermático en el varicocele grado I mejora con el tratamiento antioxidante oral.

SUMMARY

Introduction

Varicocele is one of the main causes of male infertility. The surgical treatment of varicocele is indicated for patients with infertility in combination with clinical or palpable varicocele. Microsurgical varicocelectomy has demonstrated to be the best procedure for its repair.

Grade I varicocele or subclinical, in which it is not recommended this surgical treatment, could be as well an infertility cause. Antioxidant treatment has demonstrated seminal quality improvements, but there is no prior data to investigate the effect on varicocele patients.

Reactive oxygen species, that are highly generated in varicocele patients, can damage sperm DNA, principally due to guanine modifications. In our group, we thought that the effect of DNA damage could be more intense because the telomeres are rich in guanine, fact that could also compromise fertility.

Hypothesis and Objectives

In the view of the above, in one hand, we tried to analyze the effect of microvaricocelectomy to the telomere length and sperm DNA fragmentation, and its effect on seminal parameters. On the other hand, in subclinical varicocele patients, we tried to assess the effect of antioxidant treatment in seminal parameters and in sperm DNA fragmentation.

Material and Methods

For this purpose, 12 fertile donors and 40 infertile varicocele patients were included in the study and divided in two groups:

- ▶ Group 1: 20 clinical varicocele patients, in which we analyzed, before and 9 months after microvaricocelectomy surgical treatment, seminal parameters, sperm simple and double-strand DNA fragmentation and telomere length.

- ▶ Group 2: 20 subclinical varicocele patients, in which we analyzed, before and after 3 months of oral antioxidant treatment with a multivitamin complex, seminal parameters and sperm DNA fragmentation.

Results

Comparing with fertile donors, varicocele had no effect on telomere length. Results showed that microsurgical varicocelectomy had no effect on telomere length before and after treatment. However, we observed significant statistical differences in seminal parameters and sperm simple and double DNA fragmentation.

Referring to antioxidant treatment in subclinical varicocele patients, we demonstrated a significant reduction on sperm DNA fragmentation, whilst we only observed changes in total sperm count in favor to the treatment, without observing changes in the rest of seminal parameters.

Conclusions

On the basis of the findings, we are able to affirm that in our series we have not found an effect of varicocele and its surgical treatment over sperm ADN telomere length. We have confirmed improvements in sperm DNA simple and double strand fragmentation levels due to surgical treatment and improvements on seminal parameters.

Moreover, data suggest that sperm DNA integrity, in varicocele grade I patients, improve with oral antioxidant treatment.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
RESUMEN DE LA TESIS.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	29
<i>1.1 Infertilidad</i>	<i>31</i>
1.1.1 Infertilidad masculina	32
<i>1.2. Varicocele.....</i>	<i>35</i>
1.2.1 Generalidades	35
1.2.2 Anatomía básica	35
1.2.3 Definición.....	39
<i>1.3 Epidemiología</i>	<i>41</i>
<i>1.4 Fisiopatología.....</i>	<i>46</i>
<i>1.5 Diagnóstico.....</i>	<i>49</i>
1.5.1 Exploraciones complementarias	51
<i>1.6 Tratamiento.....</i>	<i>56</i>
1.6.1 Introducción al tratamiento	56
<i>1.6.1.1 Indicaciones del tratamiento del varicocele.....</i>	<i>57</i>
<i>1.7 Tipos de tratamiento</i>	<i>60</i>
1.7.1 Procedimientos radiológicos	60
1.7.2 Procedimientos quirúrgicos.....	63
<i>1.7.2.1 Complicaciones de las técnicas quirúrgicas</i>	<i>69</i>
<i>1.8 Tratamiento del varicocele y su influencia en la fertilidad.....</i>	<i>70</i>
1.8.1 Efectos fisiopatológicos	70
1.8.2 Efectos sobre los parámetros seminales	71
1.8.3 Efectos sobre la fertilidad	71
<i>1.9 La espermatogénesis.....</i>	<i>72</i>

1.9.1 Espermatogénesis o espermatocitogénesis.....	73
1.9.2 Espermiogénesis o espermiogénesis.....	75
1.9.3 Regulación hormonal.....	77
1.10 Fragmentación del ADN espermático.....	79
1.10.1 Generalidades.....	79
1.10.1.1 ADN espermático.....	79
1.10.1.2 Definición.....	79
1.10.2 Etiología de la fragmentación del ADN espermático.....	81
1.10.3 Varicocele y fragmentación del ADN espermático.....	89
1.11 Telómeros y longitud telomérica.....	94
1.12 Antioxidantes.....	96
1.12.1 Generalidades.....	96
1.12.2 Antioxidantes y salud general.....	99
1.12.3 Prevención del estrés oxidativo y fragmentación de ADN espermático en el hombre infértil.....	101
1.12.4 Tratamientos antioxidantes.....	102
1.12.5 Conclusiones sobre los antioxidantes.....	111
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	117
2.1 Hipótesis.....	119
2.2 Objetivos.....	119
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	121
3.1 Pacientes.....	123
3.1.1 Procedencia.....	123
3.1.2 Diagnóstico.....	123
3.1.3 Criterios de inclusión y exclusión.....	125
3.1.4 Grupos de pacientes y controles.....	126
3.1.5 Consentimiento informado y comité de ética.....	127

3.2 Muestras de semen	128
3.2.1 Obtención de las muestras.....	128
3.3 Técnicas de análisis del semen	129
3.3.1 Seminograma	129
3.3.2 Criopreservación	129
3.3.2.1 Medio de criopreservación.....	129
3.3.2.2 Criopreservación en Test-Yolk-Butter (TYB)	130
3.3.2.3 Descongelación y lavado de las muestras de semen	131
3.4 Fragmentación de ADN espermático	131
3.4.1 Análisis de fragmentación de ADN espermático: Ensayo Cometa (COMET ASSAY)	131
3.4.1.1 Soluciones necesarias.....	132
3.4.1.2 Protocolo	133
3.4.1.3 Análisis por microscopia de fluorescencia.....	135
3.5 Medida de la longitud telomérica	135
3.5.1 Descongelación y lavado	135
3.5.2 Fijación y extensión celular	135
3.5.3 Descompactación de la cromatina espermática	136
3.5.4 PNA-qFISH.....	136
3.5.5 Análisis de fluorescencia.....	137
3.6 Análisis estadístico	137
4. RESULTADOS	141
4.1 Resultados del primer grupo	143
4.1.1 Correspondientes a los objetivos 1 y 2.....	143
4.2 Resultados del segundo grupo	147
4.2.1 Correspondientes al objetivo 3	147
Artículo 1	150

<i>Artículo 2</i>	150
5. DISCUSIÓN	153
5.1 Discusión	155
5.1.1 Discusión respecto al objetivo 1	155
5.1.2 Discusión respecto al objetivo 2	156
5.1.3 Discusión respecto al objetivo 3	158
5.2 Limitaciones del estudio	161
5.3 Líneas de investigación futuras	162
6. CONCLUSIONES	165
6.1 Conclusiones	167
7. BIBLIOGRAFÍA	169
8. ANEXOS	203
ANEXO I.....	205
ANEXO II.....	224
ANEXO III.....	230
ANEXO IV.....	233

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Diagnóstico diferencial de la infertilidad masculina	34
Tabla 1.2: Complicaciones y recurrencias según las distintas técnica de tratamiento utilizadas (promedio de diversos estudios)	70
Tabla 1.3: Resumen de resultados de estudios: Fragmentación de ADN espermático por varicocele o por otras causas	91
Tabla 1.4: Fragmentación de ADN espermático en varones con varicocele sin infertilidad	92
Tabla 1.5: Efecto de varicocelectomía en DD (cromatina) y ADN	93
Tabla 3.1: Valores umbral de normalidad	125
Tabla 3.2: Grupos de pacientes.....	126
Tabla 4.1: Comparación de la LT entre pacientes infértiles con varicocele clínico y donantes de esperma fértiles	143
Tabla 4.2: Comparación de la LT entre pacientes infértiles con varicocele pre y post tratamiento con microvaricocelectomía.....	143
Tabla 4.3: Parámetros del seminograma en pacientes con varicocele clínico una semana antes y nueve meses después de MV (n=20). Valores representados en mediana (rango).....	146
Tabla 4.4: Número de fluorocromos FITC adjuntos y medida de la IF de 3 grupos de esferas fluorescentes	146
Tabla 4.5: Resumen de los principales valores del seminograma clásico en pacientes con varicocele grado I antes y después del tratamiento antioxidante oral	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Anatomía testicular	36
Figura 1.2: Esquema anatomía testicular.....	37
Figura 1.3: Esquema anatómico vena espermática a su llegada a vena renal.....	38
Figura 1.4: Anatomía de venas espermáticas.....	39
Figura 1.5: Síndrome del cascanueces.....	40
Figura 1.6: Esquema del drenaje venoso del testículo y del epidídimo	41
Figura 1.7: Esquema de inserción de venas testiculares.....	43
Figura 1.8: Esquema de válvulas venosas	44
Figura 1.9: Situs inversus	45
Figura 1.10: Exploración física de varicocele	50
Figura 1.11: Análisis del semen mediante sistema automático SCA (Sperm Class Analyzer de Microptic®) .	52
Figura 1.12: Termografía escrotal.....	53
Figura 1.13: Imagen de gammagrafía escrotal	53
Figura 1.14: Flebografía escrotal	54
Figura 1.15: Ecografías Doppler escrotales.....	55
Figura 1.16: Flebografía pre y post tratamiento de embolización endovascular	61
Figura 1.17: Esquema abordaje subinguinal en la imagen izquierda, e inguinal en la imagen derecha.....	64
Figura 1.18: Diferentes accesos para varicocelectomía.....	65
Figura 1.19: Detalle de técnica de varicocelectomía.....	65
Figura 1.20: Diferentes detalles de técnica de varicocelectomía laparoscópica.....	66
Figura 1.21: Detalle de acceso y colocación de microscopio quirúrgico	68
Figura 1.22: Detalle quirúrgico de vena dilatada de plexo venoso espermático interno	68
Figura 1.23: Detalle quirúrgico de ligadura de vena dilatada del complejo venoso espermático interno	69
Figura 1.24: Espermatogénesis.....	73
Figura 1.25: Esquema de espermatozoide maduro.....	76

Figura 1.26: Esquema de regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testicular	78
Figura 1.27: Posibles alteraciones con potencial para producir roturas del ADN espermático.....	80
Figura 1.28: Esquema de etiologías del daño del ADN espermático en tres posibles niveles: testicular, epididimario y a nivel del conducto deferente.....	82
Figura 1.29: Detección de especies reactivas de oxígeno mediante precipitación de sales de tetrazolio.....	84
Figura 1.30: Esquema de estructura de los telómeros en el cromosoma	94
Figura 3.1: Criterios de clasificación de los espermatozoides según su fragmentación de ADN espermático mediante Comet neutro y Comet alcalino	131
Figura 4.1: Estimación de la LT absoluta (en Kb) para donantes fértiles y para pacientes con varicocele pre y post MV	144
Figura 4.2: FADN de cadena simple y doble (ssSDF y dsSDF, respectivamente) para pacientes con varicocele pre y post MV, y para donantes fértiles	145
Figura 4.3: Relación entre IF y TL (Kb) (línea negra), obtenida a partir del análisis de esferas FITC (puntos verdes) ($r=1,00$)	147
Figura 4.4: Diferentes tipos de daño del ADN espermático mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD).....	148

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad

El estudio de la capacidad de reproducción de los varones, es una rama que se incluye en la especialidad de Urología y, concretamente en la subespecialidad de Andrología, definida como la parte de la medicina que se encarga del estudio del estudio de las funciones reproductiva y sexual del hombre (1). Se trata de una ciencia en continua evolución, constantemente aparecen innovaciones, tanto a nivel quirúrgico como a nivel de estudio microscópico de las alteraciones seminales.

Las definiciones utilizadas más comúnmente para referirse a alteraciones de la fertilidad masculina se pueden considerar como clásicas y son fruto de consensos internacionales. Cabe comentar que dichas definiciones se refieren a la pareja y no al género masculino específicamente. Estos conceptos, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son los siguientes (2):

- ▶ **Fertilidad:** Se define como la capacidad de reproducirse que tienen los seres vivos. Si nos fundamentamos en este concepto, se aceptaría que la infertilidad es la pérdida de dicha capacidad.
- ▶ **Infertilidad:** Según la OMS, la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de concebir de forma espontánea durante el transcurso de 12 o más meses manteniendo relaciones sexuales no protegidas de manera regular (2). Aunque hay que considerar que entre el 20% y el 30% de las parejas consiguen un embarazo después de este tiempo (3). Así pues, hay que valorar el concepto de subfertilidad, que alude a la disminución de la fertilidad. El término infertilidad se relaciona también con las parejas que sufren abortos repetidamente, mientras que el término esterilidad se refiere únicamente a la incapacidad de la pareja de lograr un embarazo (4).
- ▶ **Infertilidad primaria:** Se refiere a aquella pareja que nunca ha logrado un embarazo de manera natural.
- ▶ **Infertilidad secundaria:** Concepto que se refiere a aquellas parejas que sí que han logrado un embarazo de manera natural (independientemente de que el embarazo

llegara a término o finalizara en aborto) y, que en los últimos 12 meses teniendo relaciones sexuales no protegidas con regularidad, no consiguen un embarazo.

Hay que añadir que la infertilidad es un problema clínico frecuente y, cuya incidencia está en aumento (principalmente en países desarrollados) y su prevalencia mundial se estima entre el 13% y el 15% (5) (6). Según la literatura más reciente, las causas de infertilidad se dividen en: factor masculino, representando un 21% de los casos; factor femenino, presente en el 33% de los casos; una combinación de ambos factores masculino y femenino, en el 40% de los casos y una ausencia de causa aparente que explique el origen de la infertilidad en un 6% de los casos (7).

1.1.1 Infertilidad masculina

Como hemos citado anteriormente, la infertilidad masculina aislada representa el 21% de casos de infertilidad, y está presente en el 21%-61% de los casos cuando se trata de una combinación de ambos factores, el masculino y el femenino (7). La infertilidad masculina es un motivo de consulta frecuente en el urólogo. Aproximadamente, el 8% de varones en edad reproductiva precisarán de atención médica por problemas de infertilidad (8), demostrando la importancia de la evaluación del hombre en el estudio de infertilidad de la pareja.

Las causas de infertilidad masculina son muy diversas; así, se han descrito multitud de etiologías que pueden originar infertilidad masculina: alteraciones genéticas, infecciosas, hormonales, obstrucciones de la vía seminal, varicocele, alteraciones de la eyaculación... (9), y un no despreciable número de pacientes en los cuales no podemos definir la etiología precisa de la infertilidad y ante los que carecemos del oportuno diagnóstico y tratamiento (10). De ellos, hasta un 10% presentan una causa reversible afectando a su potencial de fertilidad (como pueden ser consumo de tabaco, alcohol, drogas, exposiciones laborales, etc.). Las causas más frecuentes de infertilidad masculina se pueden clasificar según las guías de la OMS de la siguiente manera (8): O bien de manera esquemática como proponen Stahl P y cols (*Ver Tabla 1*):

- ▶ Causas pre-gonadales: Desórdenes hipotalámicos, como el síndrome de Kallmann, Hiperprolactinemia, Hipopituitarismo, Hipogonadismo de múltiples causas, consumo de drogas, alcohol o tabaco, endocrinopatías como la diabetes mellitus o tiroidopatías, celiacía.
- ▶ Causas Testiculares: Varicocele, criptorquidia (anomalía congénita más frecuente de los genitales masculinos (11), traumatismos, factores laborales que aumenten la temperatura testicular, tumor testicular, alteraciones genéticas (microdelecciones del cromosoma Y, síndrome de Klinefelter), infecciones testiculares, disgenesia testicular, antecedente de cirugía urológica testicular.
- ▶ Causas post-gonadales: Obstrucción de conductos, ausencia congénita de conductos deferentes, infecciones prostáticas, eyaculación retrógrada, defectos acrosómicos de penetración en óvulo.

Tabla 1.1: Diagnóstico diferencial de la infertilidad masculina

Causas pre-testiculares

Hipogonadismo hipogonadotrofo congénito

Patología hipofisaria: tumores, enfermedades infiltrativas e infartos

Patología suprarrenal: tumores e hiperplasia suprarrenal congénita

Infecciones sistémicas, incluyendo enfermedades virales y tuberculosis

Neoplasias sistémicas

Abuso de esteroides anabólicos

Causas testiculares

Varicocele

Síndrome de Klinefelter

Microdeleciones del cromosoma Y

Tumores de células germinales

Tumores de células de Leydig o de células de Sertoli

Falla testicular idiopática

Daño vascular o traumático

Orquitis previa

Exposición a gonadotoxinas: quimioterapia, radiación, fármacos, calor

Causas post-testiculares

Obstrucción epididimaria congénita, iatrogénica o postinflamatoria

Obstrucción de conductos deferentes congénita, iatrogénica o postinflamatoria

Obstrucción de conductos eyaculadores

Disfunción sexual o eyaculatoria

Fuente: Elaboración propia a partir de Stahl P y cols (2012) (12)

En general, cualquier proceso que afecte a la producción y la calidad del semen es potencialmente perjudicial para la fertilidad masculina. Las causas más frecuentes de alteraciones de la fertilidad masculina se han analizado en numerosos estudios poblacionales, como resumen en sus actualizaciones sobre el tema Esteves SC y Cols, siendo el varicocele la causa más frecuente de infertilidad masculina, estando presente en un 26,4% de los casos de manera única y en el 35% de casos de manera combinada a otras alteraciones. (13) En la distribución del resto de porcentajes, destaca que en un 12% de los casos la infertilidad es idiopática.

1.2. Varicocele

1.2.1 Generalidades

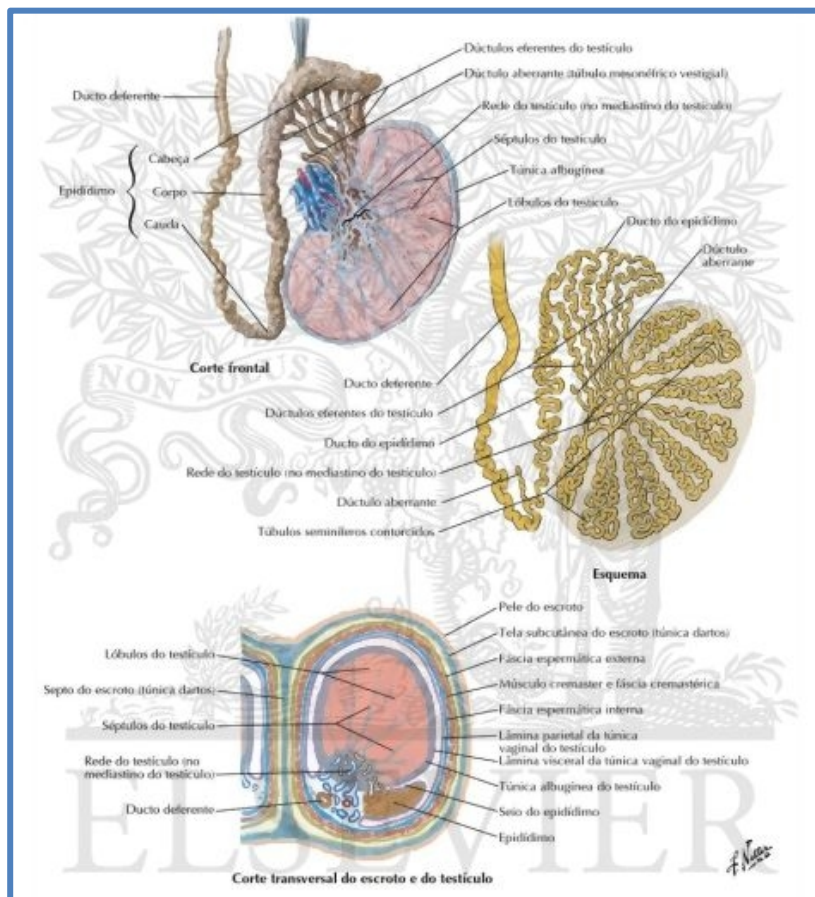
El varicocele es una patología bien conocida desde los inicios de la historia de la medicina. Celso en el siglo I d.c. (14) describió la existencia de varicoceles y los clasificó en superficiales y profundos haciendo las primeras notificaciones de una disminución del tamaño testicular del lado afecto. Hipócrates también escribió acerca de su existencia. En 1880 se relaciona varicocele e infertilidad en los estudios realizados por Bartfield y Cols (15). Macomber y Sanders ya en 1929 (16) informan acerca de la restitución de la fertilidad después de la varicocelectomía quirúrgica. A pesar de las numerosas evidencias bioquímicas, clínicas y patológicas (17), no ha sido totalmente aclarada la relación exacta del varicocele con la fertilidad, así como tampoco el mecanismo fisiopatológico por el que el varicocele produce dichas alteraciones.

1.2.2 Anatomía básica

El origen del drenaje venoso intratesticular está formado por una serie de redes capilares intersticiales y peritubulares (*Ver Figura 1.1*). Dichos capilares se dirigen a los tabiques interlobulillares, convergiendo en la retetestis o por la capa interna de la albugínea (18).

Todos estos conglomerados venosos se fusionan en el hilio testicular situándose por delante del conducto deferente, formando, una vez se introducen en el cordón espermático, el plexo pampiniforme, que posteriormente da lugar a la vena espermática interna (*Ver Figura 1.2*).

Figura 1.1: Anatomía testicular



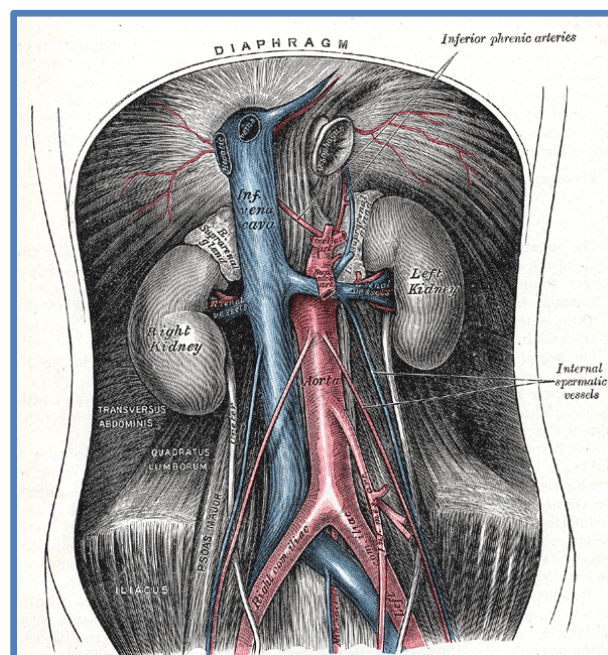
Fuente: netterimages.com, Ed. ElSevier

Figura 1.2: Esquema anatomía testicular

Fuente: Archivos Españoles de Urología (2004) (19)

El drenaje venoso de la cola del epidídimo se lleva a cabo por otro conglomerado llamado plexo venoso cremastérico que desembocará en la vena epigástrica inferior y ésta, a su vez, en la vena ilíaca externa. Se ha descrito un tercer plexo venoso llamado perideferencial que dará lugar a la vena deferencial que desembocará en la vena vesical superior. La vena espermática interna sigue un recorrido retroperitoneal ascendente hasta su drenaje en la vena renal izquierda en el lado izquierdo y en la vena cava inferior en el lado derecho (*Ver Figura 1.3*).

Figura 1.3: Esquema anatómico vena espermática a su llegada a vena renal

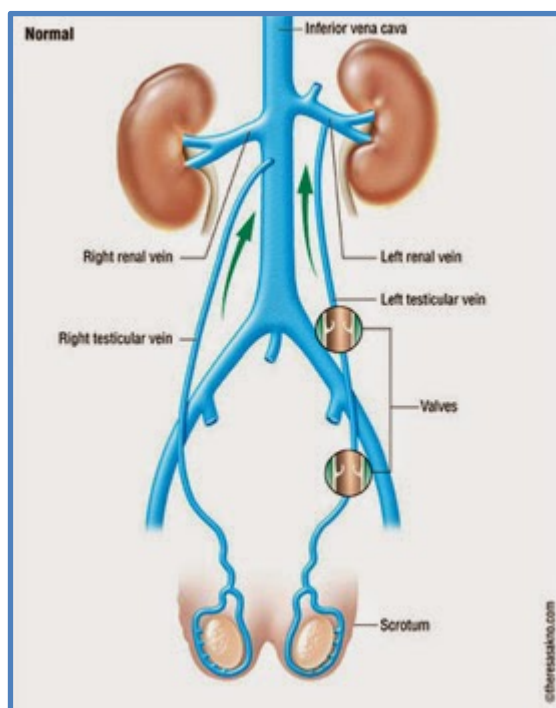


Fuente: Henry Gray, *Anatomy of the Human Body* (1918) The bartleby.com edition

El recorrido de la vena espermática izquierda es más largo que el de la derecha, lo cual favorece su dilatación. Además, un 40% de varones, carecen de válvulas ostiales (que favorecen el buen drenaje venoso) en la vena espermática izquierda, frente a un 23% en el lado derecho. A lo anterior debemos añadir que, cuando dichas válvulas están presentes, son incompetentes el doble de veces en el lado izquierdo que en el derecho (20) (*Ver Figura 1.4*).

Existen numerosas anastomosis descritas de la vena espermática interna en su recorrido ascendente, principalmente con la vena lumbar ascendente y la vena mesentérica inferior. De igual modo se han descrito anastomosis entre venas del sistema espermático izquierdo y el derecho a través de las venas pelvianas profundas, dando lugar a una de las posibles explicaciones de la toxicidad bilateral que se produce sobre los testículos la presencia de varicocele unilateral. Existen asimismo numerosas interconexiones entre los plexos cremastérico, anterior y deferencial (21).

Figura 1.4: Anatomía de venas espermáticas



Fuente: Anatomía en varicocele, urologiaperuana.org

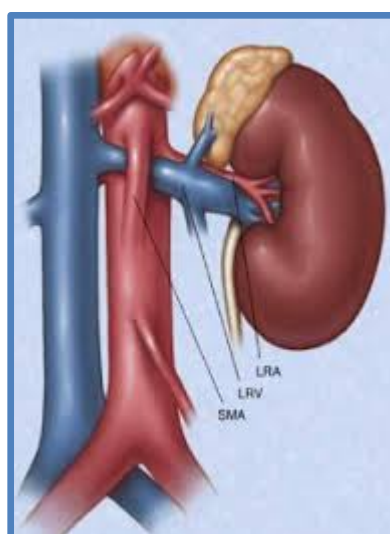
1.2.3 Definición

El varicocele se define como la dilatación anormal de las venas espermática y escrotal y del plexo pampiniforme y secundariamente de la vena espermática interna. Esto ocurre como consecuencia de un aumento de presión intravascular y una ausencia o incompetencia valvular venosa que condiciona la presencia de un reflujo retrógrado anómalo de la vena espermática interna (22). Se ha encontrado una asociación directa entre varicocele e infertilidad masculina, observándose que un alto porcentaje de varones infértiles con un seminograma alterado padecían de manera asociada un varicocele.

Existen principalmente dos tipos de varicocele. El varicocele primario o también denominado idiopático y el varicocele secundario (aquel en que se conoce la causa que lo produce). El varicocele idiopático se debe a una insuficiencia o ausencia valvular que condiciona el aumento de presiones y reflujo retrógrado de la vena espermática y el plexo pampiniforme y es la causa más frecuente de varicocele.

El varicocele secundario se debe a la compresión del drenaje venoso que puede darse por diversas causas, principalmente por un proceso tumoral retroperitoneal compresivo. Una de las causas no maligna de varicocele secundario es la presencia del síndrome del “cascanueces” (*Ver Figura 1.5*), entidad en la que la vena renal izquierda queda comprimida entre la horquilla que forman la arteria aorta intraabdominal y la arteria mesentérica superior, originando un aumento de presiones que se transmiten de forma retrógrada al plexo pampiniforme del lado izquierdo (25).

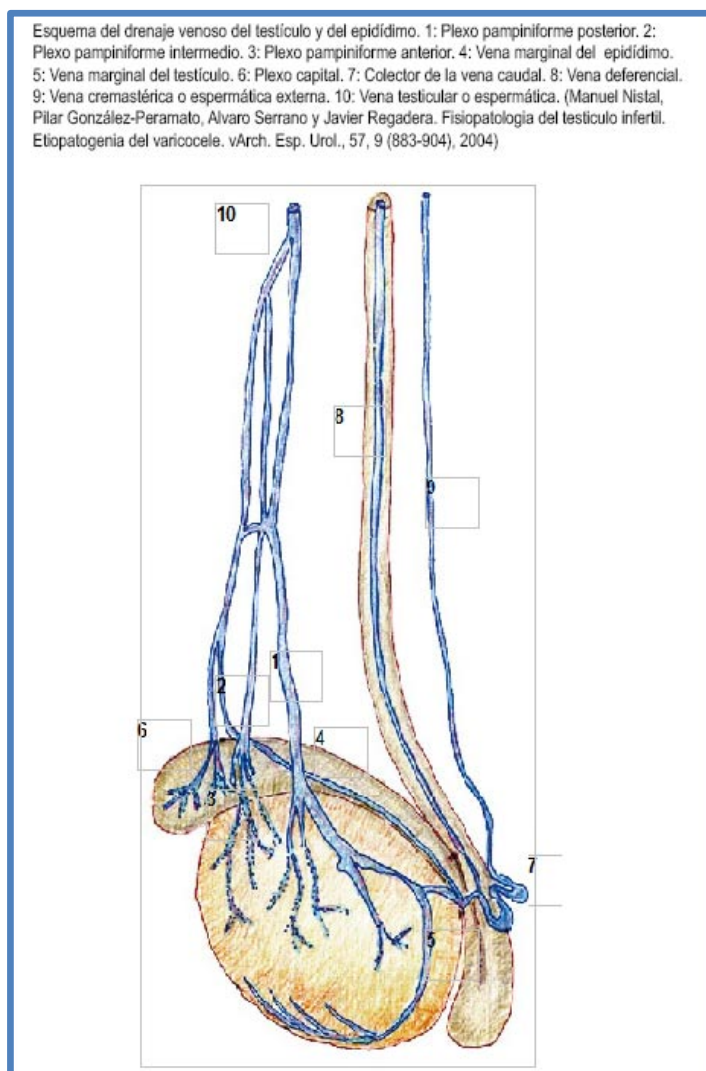
Figura 1.5: Síndrome del cascanueces



Fuente: Mileon Files wordpress.com, Solcami-Cascanueces (2010)

Anatómicamente, se podrían definir tres tipos diferentes de varicocele según el plexo afecto (*Ver Figura 1.6*), el más frecuente es el espermático en el que la vena espermática y el plexo anterior son los afectados por el reflujo. Con mucha menor frecuencia se puede dar un varicocele cremastérico, el cual afecta al plexo posterior o un varicocele mixto en que ambos plexos venosos se encuentren afectados, siendo esta situación la más frecuente en un estadio evolutivo de la patología. (26)

Figura 1.6: Esquema del drenaje venoso del testículo y del epidídimo



Fuente: Archivos Españoles de Urología 2004 (19)

1.3 Epidemiología

La incidencia del varicocele descrita clásicamente es del 16% de varones adultos en la población general. Hay numerosos estudios epidemiológicos que hacen expandir la horquilla de incidencia al 15-20% (o incluso del 4,4% al 22,6%) de la población general y se encuentra presente en aproximadamente el 40% de los varones que presentan infertilidad primaria y en aproximadamente el 80% de aquellos hombres que presentan infertilidad secundaria (25) (26). Las diferencias en la incidencia se deben principalmente a la variedad de criterios diagnósticos que pueden adoptarse en esta patología. Así existen estudios de incidencia basados en criterios clínicos (que son los que más se adaptan a los

valores de incidencia de aproximadamente 15-20%) y otros publicados con criterios ecográficos, termográficos, radiográficos, etc. De la misma manera que las características de la población estudiada (si se incluye o no la infancia y adolescencia) influyen en los resultados de incidencia calculados.

El varicocele se encuentra de manera más frecuente en el lado izquierdo comunicándose porcentajes desde 70% a 100% dependiendo de los estudios que se consulten, pero de media se considera que en más del 90% de los casos el varicocele es izquierdo (27). De manera más inusual la localización es bilateral (0%-25%) o derecho (0%-10%) (28).

La incidencia de varicocele izquierdo es mucho mayor que la del derecho. Según Garel y cols, la incidencia de varicocele izquierdo idiopático puede llegar a ser del 98%. (29), aunque agrupando estudios oscila en: varicocele izquierdo: 70%-100%, varicocele bilateral: 20%-25% y varicocele derecho: 0%-10% (28).

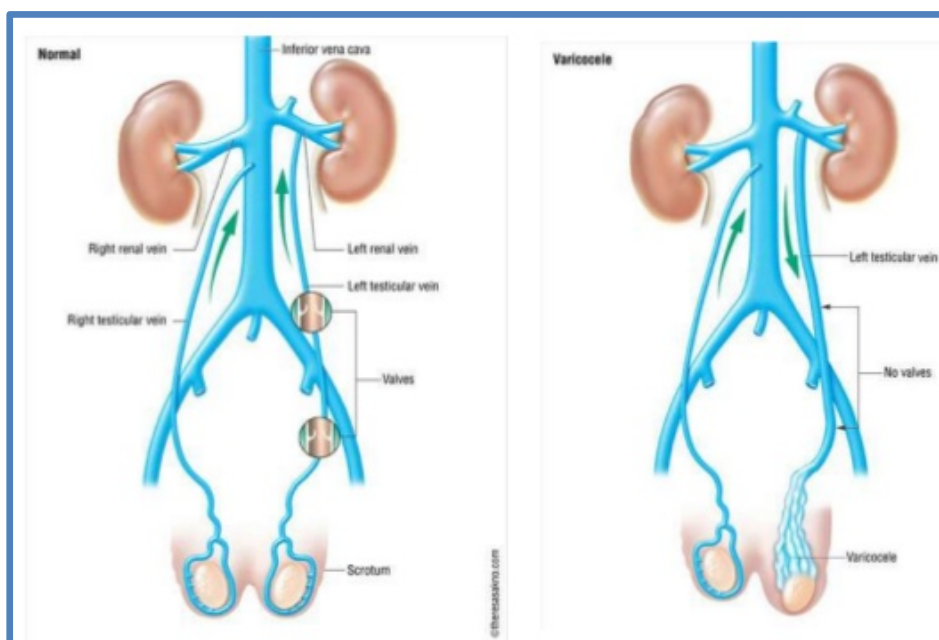
Esta marcada diferencia de incidencia entre el varicocele izquierdo y el derecho tiene principalmente bases anatómicas, aunque en la mayoría de casos el origen del varicocele se considera idiopático por una combinación de varias alteraciones.

Las principales causas anatómicas de que la incidencia de varicocele izquierdo sea mayor al derecho son:

- ▶ Recorrido de mayor longitud de la vena espermática izquierda respecto a la derecha, provocando un aumento de presión hidrostática en dicha vena.
- ▶ Existencia de condiciones más favorables para el drenaje venoso de la vena espermática derecha, dado que dicho drenaje se realiza con una angulación de 30°-40° en la vena cava inferior, mientras que la vena espermática izquierda drena con un ángulo de 90° en la vena renal izquierda. A este hecho anatómico puro se añade que las presiones en el interior de la vena renal izquierda son mayores que las de la vena cava inferior.

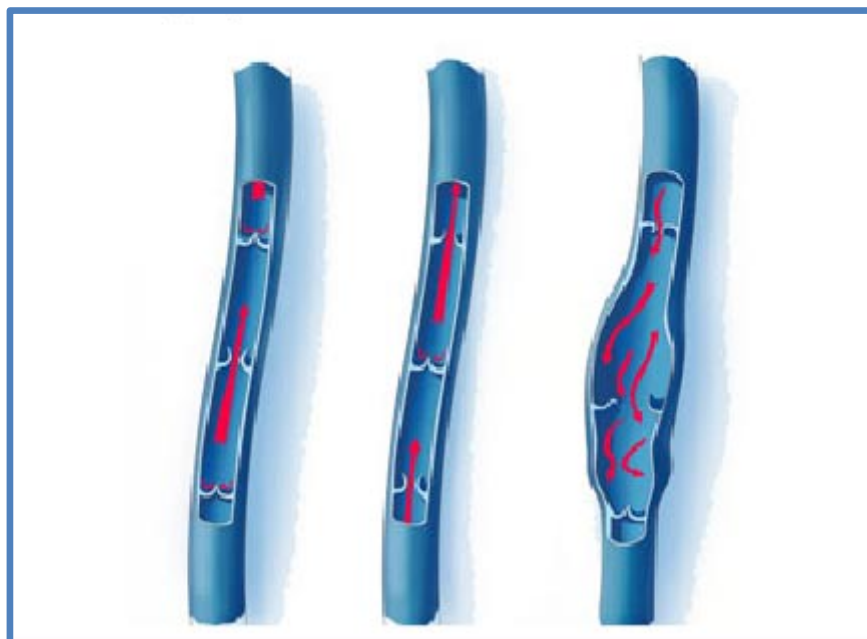
- ▶ Posibilidad de pinzamiento de la vena renal izquierda, aumentando las presiones de la misma por medio de la pinza que forman la arteria mesentérica superior a su salida de la arteria aorta, dando lugar al que comúnmente se conoce como síndrome del “cascanueces” (*Ver Figura 1.5*, (síndrome del cascanueces)).
- ▶ Existencia de una menor cantidad o de ausencia total congénita de válvulas ostiales en la vena espermática izquierda (*Ver Figura 1.7*).
- ▶ Presencia de un mayor número de válvulas incompetentes en la vena espermática izquierda que en la derecha (*Ver Figura 1.8*).
- ▶ Estos dos últimos factores hacen especialmente susceptible a la vena espermática izquierda a los efectos que produce la presión hidrostática de la columna de vertical que se genera cuando se adopta la posición de bipedestación, hechos demostrados en estudios flebográficos por Comhaire y cols. hace más de 40 años (30).

Figura 1.7: Esquema de inserción de venas testiculares



Fuente: Anatomía en varicocele, urologiaperuana.org

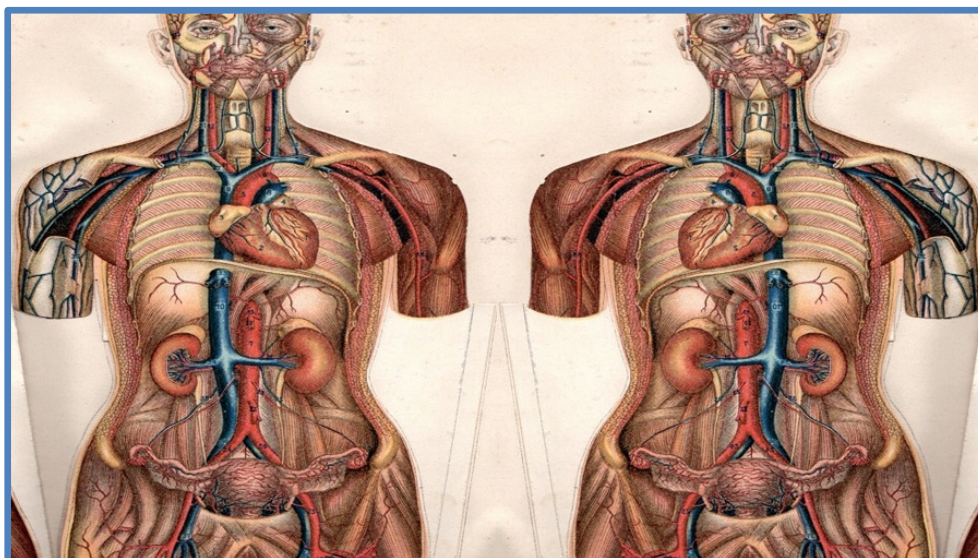
Figura 1.8: Esquema de válvulas venosas



*En las venas sanas, las válvulas cierran correctamente y previenen el reflujo. En venas afectas, el cierre inadecuado permite el reflujo de sangre y la dilatación del plexo pampiniforme

Fuente: Beck y cols (1992) (31)

La frecuencia tan reducida de varicocele derecho aislado, hace que cuando aparece en la clínica, nos obligue a pensar y descartar la presencia de un proceso patológico compresivo retroperitoneal, posiblemente de origen tumoral, un drenaje anómalo de la vena renal o bien la existencia de un *situs inversus* (Ver Figura 1.9) (32).

Figura 1.9: Situs inversus

Fuente: invdes.com.mx/salud

La existencia de un varicocele bilateral se debería a la posible presencia de comunicaciones suprapúbicas entre ambos plexos pampiniformes derecho e izquierdo (como se ha comentado en el apartado de anatomía) (*Ver Figura 1.6*).

La presencia de todos estos factores anatómicos junto con a la ausencia o incompetencia valvular de la vena espermática, que se ve incrementada por el aumento de presión hidrostática provocado por la bipedestación humana, explicarían la existencia de esta patología en exclusiva en el varón humano y su ausencia en el resto de especies del reino animal (22).

A estos procesos, se añade que la persistencia durante un largo tiempo de la congestión venosa, condiciona la sujeción e inmovilidad anatómica de la ectasia venosa, secundariamente a una hipertrofia de la capa media muscular de la pared venosa y una hipoplasia de las fibras elásticas, mecanismo idéntico a la formación de varices de las extremidades inferiores. Tal y como sugieren Shafik y cols en sus estudios existe una atrofia de la función de bomba de la fascia muscular (33), la denominada “bomba fasciomuscular” formada por la fascias espermáticas interna y externa y por la fascia cremastérica que rodean al cordón espermático y que actúa favoreciendo el flujo venoso. Si

esta bomba deja de funcionar con normalidad, las venas espermáticas y el plexo pampiniforme se relajan, favoreciendo la aparición de ectasia venosa.

1.4 Fisiopatología

La alteración que provoca la dilatación venosa sobre la función de los testículos no ha podido ser aclarada de manera firme y concluyente. Se han propuesto varias teorías con el objetivo de intentar explicar cuáles son los efectos perjudiciales sobre la espermatogénesis. Estas teorías las vamos a desarrollar más adelante.

Esta ausencia de explicación única se debe mayoritariamente a que el varicocele y sus lesiones asociadas a nivel gonadal, así como la alteración de la función testicular aparecen debido a un proceso multifactorial, donde diferentes agentes perjudiciales actúan de manera simultánea o de manera sucesiva sobre la gónada afectada por el propio varicocele.

El proceso inflamatorio que afecta a la función testicular ocurre principalmente cuando las válvulas de la vena espermática no permiten el correcto flujo de sangre, circunstancia que da lugar a varios procesos nocivos sobre la espermatogénesis, como son esencialmente: hipertermia escrotal, estrés oxidativo, alteraciones hormonales, hipoxia testicular y reflujo de metabolitos tóxicos renales. Estos procesos han demostrado tener un efecto perjudicial sobre la histología testicular y la maduración espermática, los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático, lo que puede finalmente dar lugar a una alteración de la fertilidad.

Las teorías más importantes que se han propuesto para definir cómo el varicocele puede afectar al proceso de espermatogénesis son las siguientes:

1. Hipertermia escrotal:

La elevación de la temperatura de ambos testículos da lugar a una disminución en la espermatogénesis. Este hecho fue documentado por Zorngiotti y cols en 1979, midiéndose la temperatura testicular por termografía de la superficie escrotal (34), y parece que pueda ser el factor fisiopatológico de mayor importancia en relación a la infertilidad. El mantenimiento en condiciones normales de la temperatura testicular a

1-2 °C por debajo de la temperatura corporal se produce gracias a los excelentes mecanismos de termorregulación del escroto, gracias a su piel fina, con mínimo tejido adiposo, una gran riqueza de tejido linfático y unas envolturas elásticas (35). La consecuencia principal del reflujo de sangre venosa y aumento de presión hidrostática es el aumento de temperatura. Se ha podido demostrar un aumento de la temperatura de ambos testículos en pacientes con varicocele en comparación a varones sanos. La respuesta fisiopatológica a ese aumento de temperatura es una alteración de la permeabilidad tisular de los túbulos seminíferos llevando a una pérdida de espermátidas y de espermatoцитos (35).

El tratamiento quirúrgico del varicocele ha demostrado un descenso de la temperatura hasta valores normales (36).

2. Alteraciones hormonales:

Clásicamente se ha postulado la posibilidad de que la disfunción hormonal pueda contribuir a la fisiopatología del varicocele (37).

Aunque en algún estudio, como el de Amadopoulos y cols se ha informado que no existen diferencias en los niveles de testosterona entre pacientes con varicocele respecto a controles sanos (38), en un estudio de la OMS de 1992 sobre más de 9000 pacientes con varicocele, se demostró que la concentración de testosterona en varones con varicocele mayores de 30 años era significativamente menor en comparación a pacientes jóvenes afectados de varicocele (39).

Se ha demostrado una insuficiencia en la función del eje hipotálamo-hipofisario-testicular en forma de una respuesta excesiva de las hormonas luteínica (LH) y folículo estimulante (FSH) en aquellos pacientes que presentaban varicocele asociado a oligozoospermia severa, asociando una menor respuesta en la síntesis de testosterona, hecho que no ocurría en aquellos pacientes con varicocele y normozoospermia o bien oligozoospermia no severa (40).

3. Hipoxia testicular:

Se postula que el varicocele se asocia a un aumento de la hipoxia, hecho que contribuiría a una disfunción endotelial y por tanto, de la función testicular. Este postulado se establece a raíz de los estudios de Kilinc y Lee, cuyos trabajos demuestran una expresión aumentada del factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1- α) tanto en ratas con varicocele en el trabajo de Kilinc, como en varones con varicocele grado III en el estudio de Lee, donde objetiva hasta 7 veces más niveles de HIF-1-alfa en pacientes con varicocele que en varones sanos (41) (42).

4. Reflujo de metabolitos tóxicos renales y adrenales:

Este mecanismo de reflujo, contribuye a la alteración de la fertilidad de los pacientes con varicocele. Estudios realizados con flebografía demuestran el reflujo que recibe la vena espermática de la vena renal (43). Si se añade el factor anatómico de la ectasia venosa y la tortuosidad del complejo venoso del plexo pampiniforme, todo ello contribuye al reflujo de metabolitos renales y adrenales que resultan tóxicos y que por su efecto vasoconstrictor, dificultan la función testicular. En diferentes estudios se han encontrado niveles elevados de catecolaminas y prostaglandinas E y F en sangre extraída de la vena espermática en pacientes con varicocele (44).

5. Estrés oxidativo:

En condiciones normales, en varones sanos, existe un equilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes naturales que presenta el semen (45). En varones con varicocele, tanto en fértiles como en infértiles, la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) es más elevada que en los controles sin varicocele (46). La consecuencia de este aumento de las sustancias reactivas de oxígeno es una alteración de la movilidad y la vitalidad espermáticas y un aumento de los defectos de la pieza intermedia del propio espermatozoide, dando lugar a alteraciones en la capacitación espermática y la reacción acrosómica (47). Esta situación en pacientes con varicocele da lugar a alteraciones en la integridad del ADN del espermatozoide, fragmentación de ADN con roturas tanto de cadena simple como de cadena doble (48).

1.5 Diagnóstico

Los motivos de consulta por los que un paciente con varicocele puede acudir a la consulta de un urólogo son muy variados. Entre ellos destacan:

- ▶ La presencia de un bulto referido en la parte superior del testículo.
- ▶ La visualización de un acúmulo de venas varicosas del plexo pampiniforme en la parte superior del escroto, que por su forma, se denomina clásicamente “en bolsa de gusanos”.
- ▶ Un dolor sordo o sensación de pesadez del testículo afecto.
- ▶ Como hallazgo incidental a la exploración física de una consulta por infertilidad.

Para diagnosticar un varicocele, los procedimientos más comúnmente utilizados son la exploración física y la ecografía doppler testicular. El diagnóstico de varicocele denominado “clínico o palpable” es eminentemente clínico y se consigue mediante la exploración física. En cuanto al varicocele no palpable o también denominado subclínico, se diagnostica mediante la ultrasonografía doppler testicular, y la confirmación del mismo se basa en la observación de venas dilatadas de un diámetro mayor a 3mm con presencia de flujo inverso cuando se realiza la maniobra de Valsalva (49).

Una vez finalizada la anamnesis dirigida, la realización de una exploración clínica detallada es lo que nos llevará al diagnóstico clínico de varicocele. Se recomienda iniciar la exploración con el paciente en decúbito supino, realizando una palpación meticulosa del cordón espermático, intentando identificar todos sus elementos. La palpación se debe hacer bilateral y realizarla tanto en reposo como con maniobras de Valsalva, objetivando una sensación de plenitud venosa entre los dedos al realizarse dicha maniobra. Seguidamente se realiza la misma operación, palpación del cordón en reposo y Valsalva con el paciente en bipedestación. Asimismo, se deberá realizar la palpación de ambos testículos en busca de alteraciones en tamaño y consistencia, pudiendo estar disminuidos y con un aumento de la sensibilidad al tacto. Mediante esta exploración, se podrá llegar al diagnóstico de

varicocele clínico o también denominado varicocele palpable (*Ver Figura 1.10*) y se podrá clasificar según la clasificación clásica de Dubin (50), la más aceptada internacionalmente:

1. Varicocele clínico grado III: Aquel que se ve a simple vista como una “bolsa de gusanos” en la parte superior del escroto correspondiente a la dilatación tortuosa de las venas del plexo pampiniforme. Palpable sin ninguna dificultad con el paciente en bipedestación.
2. Varicocele clínico grado II: Aquel que no se ve a simple vista pero que se palpa de manera clara tanto en reposo como con maniobras de Valsalva con el paciente en bipedestación.
3. Varicocele clínico grado I: Únicamente palpable con maniobras de Valsalva con el paciente en bipedestación.
4. Varicocele subclínico: Como aquel que solamente es detectable por exploraciones complementarias, pero que no es detectable con maniobras exploratorias.

Figura 1.10: Exploración física de varicocele



*Obsérvese por encima del testículo izquierdo, la dilatación venosa que se evidencia como una tumoración blanda, una “bolsa de gusanos”

Fuente: Fotografía cortesía del servicio de Urología del Hospital Universitario Parc Taulí, Sabadell

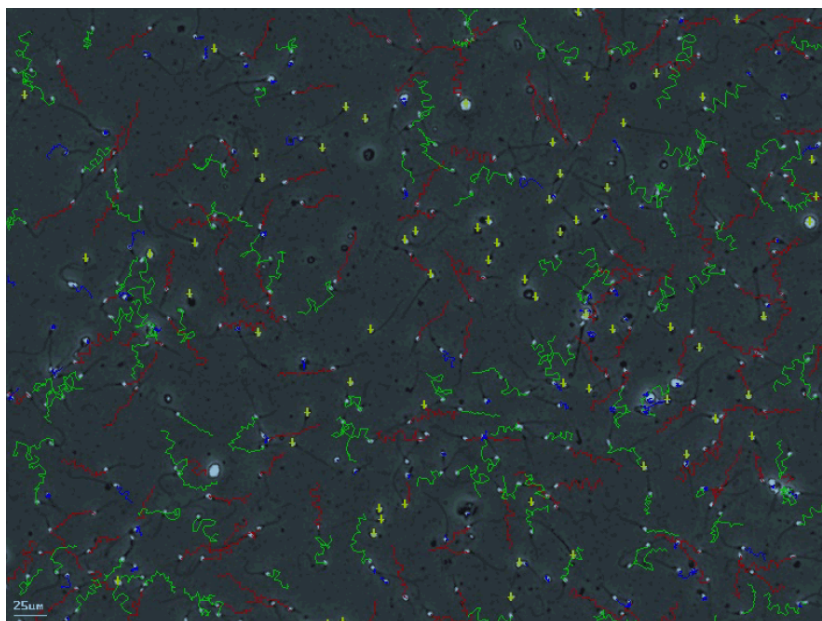
1.5.1 Exploraciones complementarias

Las exploraciones complementarias para el diagnóstico del varicocele no son estrictamente necesarias, pero ayudan a facilitar el diagnóstico y a determinar las condiciones basales en casos de varicocele asociado a infertilidad de cara a ofrecer cuando se considere necesario un tratamiento para la corrección del varicocele.

De todas las exploraciones complementarias del varicocele, la ecografía doppler testicular es la más ampliamente utilizada, por lo que la comentaremos al final con más detenimiento. De entre las exploraciones complementarias más útiles en varicocele, destacan:

- ▶ **Seminograma**: Aunque no es en sí una prueba diagnóstica de varicocele, es de gran utilidad en el estudio de la infertilidad. En los pacientes con varicocele, la alteración más importante en el seminograma es la anomalía morfológica, principalmente de la cabeza del espermatozoide y en la pieza intermedia, dando lugar a teratozoospermia. También se pueden dar al mismo tiempo alteraciones en el recuento total de espermatozoides, denominado (oligozoospermia), así como alteraciones en la movilidad espermática (astenozoospermia) (51). Daith y cols en una revisión de 2001 sugieren que es necesario para la indicación de un tratamiento reparador del varicocele, es precisa la combinación de varicocele clínico o palpable y la presencia de anomalías en por lo menos 2 determinaciones de seminograma, hecho que da importancia a la valoración de la calidad seminal en el estudio diagnóstico del varicocele (52). Así lo recomiendan las guías internacionales en sus últimas versiones, por ejemplo las guías de la Asociación Europea de Urología (53).

Figura 1.11: Análisis del semen mediante sistema automático SCA (Sperm Class Analyzer de Microptic®)

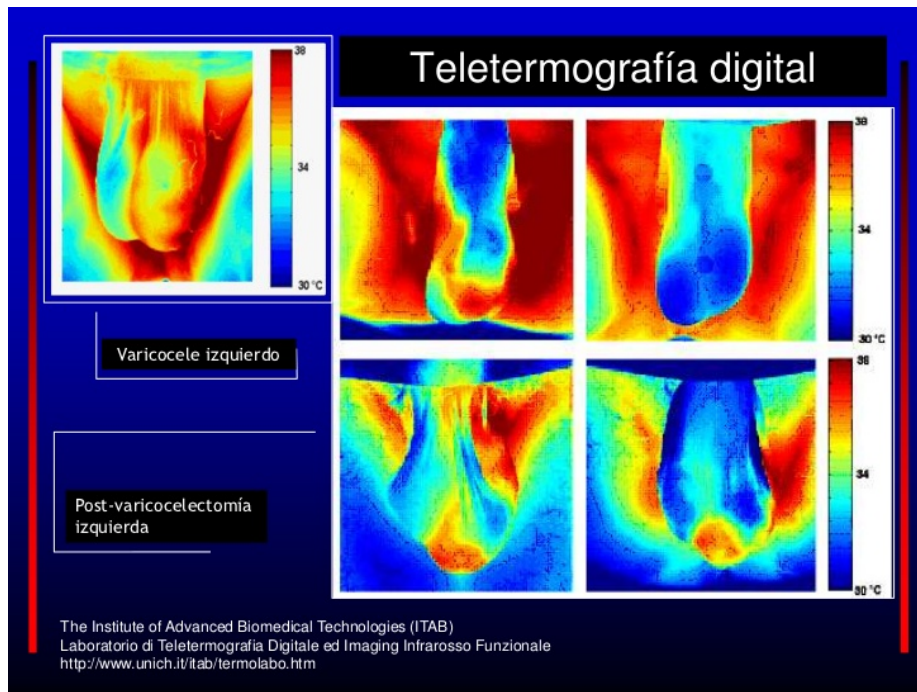


*La cámara de video detecta por contraste la presencia de espermatozoides y registra su movimiento y trayectoria así como la velocidad permitiendo establecer las diferentes categorías de movilidad espermática (progresivos, no progresivos e inmóviles) expresado en porcentaje así como el recuento por mililitro y recuento total.

Fuente: Fotografía cortesía de CIMAB (Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona)

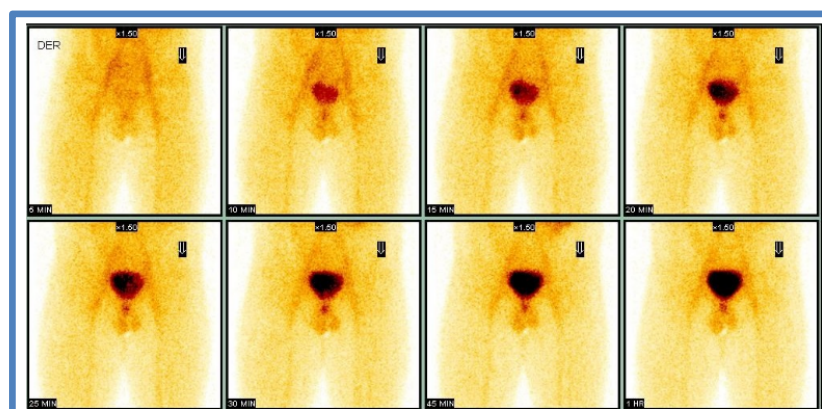
- ▶ Gammagrafía escrotal y termografía: Son técnicas prácticamente en desuso. La gammagrafía tiene una alta sensibilidad en la detección de varicoceles grado II y grado III mediante la inyección de tecnecio 99m y su visión en una gammacámara de alteraciones en el flujo testicular (54).
 - ▶ La termografía detecta diferencias en temperatura escrotal respecto a la temperatura basal. En condiciones normales, la variación de temperatura es de aproximadamente $2,2^{\circ}\text{C}$, pero en pacientes con varicocele grados II y III esta diferencia se ve disminuida, demostrando un aumento de la temperatura escrotal en pacientes con varicocele y las alteraciones en la espermatogénesis que de él se derivan (55).

Figura 1.12: Termografía escrotal



Fuente: ITAB (The institute of Advanced Biomedical Technologies)

Figura 1.13: Imagen de gammagrafía escrotal

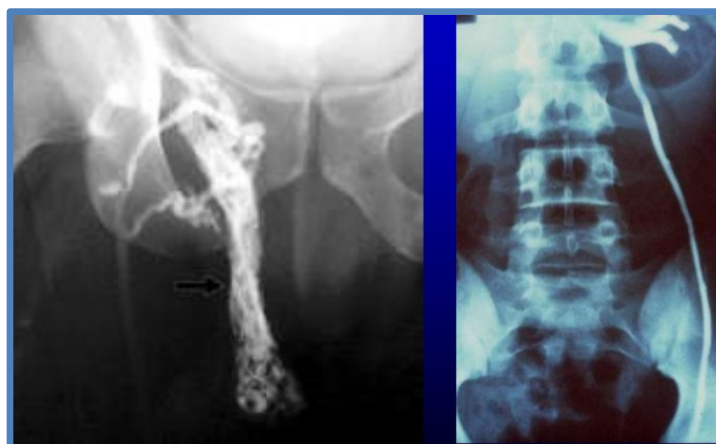


Fuente: gammagrafias.pe

- ▶ **Flebografía:** Se trata de una técnica invasiva y que precisa de personal especializado para su realización, siendo una prueba diagnóstica no exenta de morbilidad. Introducida por Alberg en 1966, es una técnica de gran fiabilidad y que en caso de precisar de una mayor precisión en el diagnóstico puede resultar de

utilidad. Es muy valiosa en caso de recidivas, para su diagnóstico y para la detección de la presencia de venas colaterales al plexo pampiniforme (56).

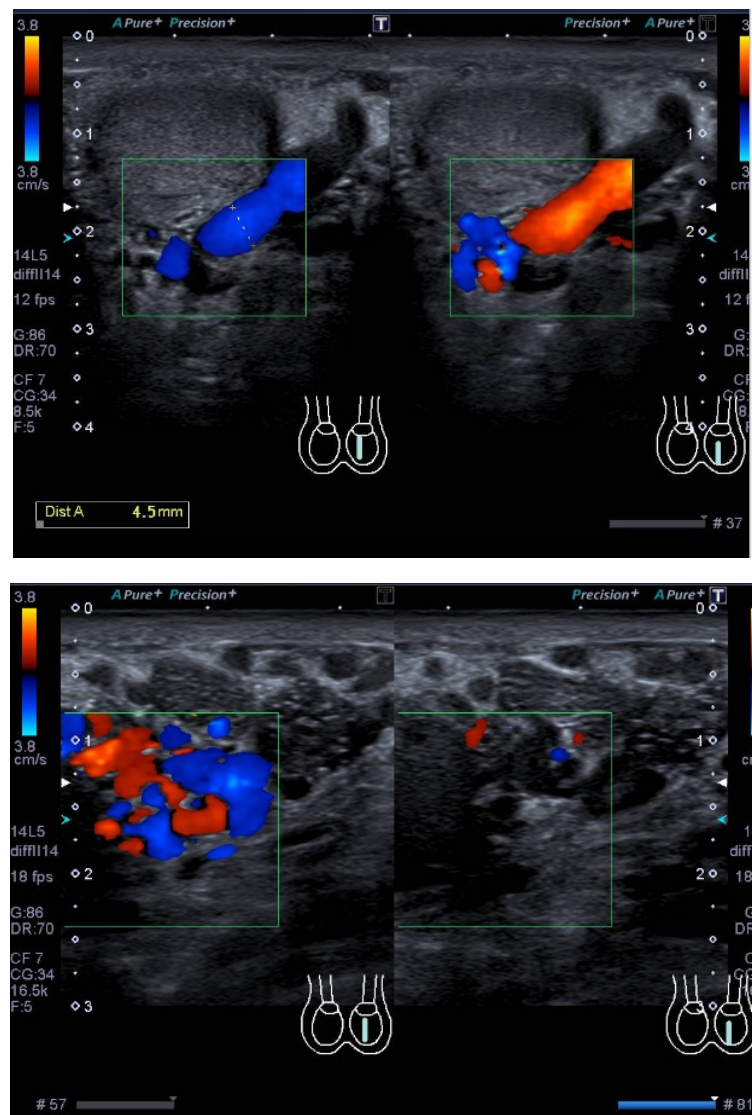
Figura 1.14: Flebografía escrotal



Fuente: Fotografía cortesía del servicio de Radiología del Hospital Parc Taulí, Sabadell

- ▶ Ecografía doppler testicular: La ecografía testicular simple es en la actualidad el método más utilizado para el diagnóstico de varicocele, a pesar de no poder proporcionar una medida cuantitativa del mismo. Con la aparición de la ecografía doppler color, se posibilita la medición de la velocidad del flujo sanguíneo, así como la dirección de dicho caudal sanguíneo. Es observador-dependiente y requiere de un correcto aprendizaje, pero es sencilla de realizar y presenta una gran sensibilidad y especificidad, por lo que ha desplazado las otras técnicas diagnósticas a un segundo plano. La prueba se realiza con el paciente en decúbito supino, pudiéndose completar la misma con el paciente en bipedestación y se visualiza la vena espermática y se puede medir el reflujo, tanto en reposo como con maniobras de Valsalva así como el calibre de las venas dilatadas, dando lugar a una clasificación ecográfica del varicocele (57).

Figura 1.15: Ecografías Doppler escrotales



*Obsérvese la dilatación venosa y la presencia del reflujo y ectasia venosos encuadrados

Fuente: Fotografía cortesía del Servicio de Radiología del Hospital Parc Taulí, Sabadell

Según el reflujo:

- ▶ Varicocele grado 1: Reflujo menor a 3 segundos durante la maniobra de Valsalva.
- ▶ Varicocele grado 2: Reflujo de entre 3 y 5 segundos.
- ▶ Varicocele grado 3: Reflujo superior a los 5 segundos.

Según la dilatación de las venas varicosas:

- ▶ Varicocele grado I: Calibre de vena máximo de 2 a 4mm.
- ▶ Varicocele grado II: Calibre venoso entre 4 y 5mm.
- ▶ Varicocele grado III: Calibre venoso superior a los 5mm.

En líneas generales, podríamos resumir que para el diagnóstico de varicocele, habrá que realizar una anamnesis completa, una minuciosa exploración física para llegar al diagnóstico de manera relativamente sencilla de varicocele clínico. El diagnóstico se podrá complementar con las exploraciones complementarias, principalmente ecografía doppler testicular y seminograma en aquellos pacientes en que se sospeche una alteración de la fertilidad. El resto de exploraciones complementarias serían reservadas para aquellos casos en que existan dudas respecto al diagnóstico o la sospecha de recidiva en los casos tratados.

1.6 Tratamiento

1.6.1 Introducción al tratamiento

El tratamiento más utilizado para el varicocele es el quirúrgico. Cuando en una consulta de Urología se plantea el tratamiento de un varicocele, se debe hacer desde varios puntos de vista:

- ▶ Puede ser que el objetivo principal del tratamiento sea una mejoría del dolor y/o la pesadez testicular que presenta el paciente. Cuando ese es el único motivo de consulta y se trata de un paciente fértil, o sin interés por la fertilidad, en este caso, el paciente debe ser informado que la mayoría de guías de tratamiento internacionales no recomiendan el tratamiento en dicho caso y que la mejoría con el tratamiento quirúrgico suele ser evidente, pero acostumbra a persistir algún tipo de molestia residual que se mantiene en el tiempo.
- ▶ Por otro lado, puede ser que el objetivo sea la mejoría de un seminograma alterado cuando se trate de un varicocele clínico o palpable. En dicho caso, la mayoría de estudios resumidos en el meta-análisis de Baazeem y cols. demuestran que existe

una mejoría significativa en el seminograma gracias al tratamiento del varicocele (58), como así lo recomiendan las Guías Europeas y americanas de Urología (59).

- ▶ Finalmente, cuando el objetivo principal del tratamiento lo marca la mejoría en las tasas de embarazo, existe controversia en la capacidad del tratamiento del varicocele para producir dicha mejoría. Los datos de los que se disponen no son concluyentes al respecto y la indicación de tratamiento reparador del varicocele con dicho objetivo es controvertida (60). Esta dificultad para correlacionar de manera directa el tratamiento del varicocele con una mejoría en las tasas de embarazo, se explicaría por la gran cantidad de factores que influyen, sea por factor masculino o femenino, en la consecución de un embarazo de manera natural.

1.6.1.1 Indicaciones del tratamiento del varicocele

Cuando se plantea la pregunta de qué pacientes se podrán beneficiar del tratamiento hay que tener en cuenta varios factores:

En primer lugar, una pregunta que permanece sin respuesta es el por qué la mayor parte de varones con varicocele y una moderada alteración de la calidad espermática responde de manera favorable al tratamiento y hay un porcentaje de pacientes que no responde (61). Para aclarar esa cuestión, es necesario intentar comprender cuáles son las repercusiones fisiopatológicas de la oclusión o ligadura de la vena espermática interna (VEI), tanto en los diferentes valores de la calidad seminal como en los cambios en la fertilidad.

Evidentemente, previamente al consejo de una corrección del varicocele, hay que tener en cuenta la situación reproductiva de la pareja y tener claras las posibilidades de gestación de la mujer en base a su edad, ovulación, permeabilidad tubárica u otras causas de infertilidad femenina que podrían hacer retrasar o incluso anular la posibilidad del tratamiento del varicocele.

Dado que el beneficio en los parámetros del seminograma se ha demostrado clásicamente que no se da en todos los pacientes tras la corrección quirúrgica (62), en primer lugar se deberían intentar marcar unos criterios que nos permitan seleccionar aquellos pacientes que se beneficiarán del tratamiento. Esto se conseguiría estableciendo factores pronósticos

basados en el tiempo de evolución y tamaño del varicocele, la intensidad y tipo de afectación del seminograma, el tiempo de infertilidad de la pareja o su edad, etc. Así como sería de gran ayuda que existieran algunos marcadores endocrinológicos que establecieran las posibilidades de éxito del tratamiento. Sin embargo, esos “tests” específicos y sensibles no están disponibles y la correcta indicación de la intervención queda a criterio del urólogo y su experiencia a la hora de evaluar las posibilidades de éxito de la intervención.

A la hora de indicar el tratamiento, queda claro que aquellos pacientes con varicocele clínico a los que ocasiona un dolor o pesadez importantes, o que representan un problema mecánico por su tamaño y que eso les afecte en su calidad de vida, aconsejan su intervención sin considerar si tienen o no deseo de paternidad.

Las alteraciones en el seminograma posiblemente son debidas a cambios hemodinámicos y el tratamiento va orientado a la corrección de dichos cambios, mediante la ligadura u oclusión de la VEI, evitándose los cambios de disregulación térmica y el reflujo de metabolitos tóxicos que pueden deteriorar la funcionalidad testicular.

La indicación de tratamiento es clara cuando existe dolor y limitación mecánica con alteración de la calidad de vida.

En cuanto a la indicación del tratamiento en otros pacientes, se deben cumplir una serie de requisitos según aconsejan las diferentes asociaciones de urología internacionales:

La Asociación Americana de Urología y la Asociación Americana de Medicina Reproductiva en sus respectivos comités de buena práctica clínica (*Urological Association's Male Infertility Best Practice Policy Committee* y *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine* respectivamente) establecieron unas sencillas bases concluyendo que el tratamiento del varicocele estaría indicado en aquellos pacientes con varicocele palpable y que se acompañara de parámetros seminales anormales (63). Más concretamente, se marcan como recomendaciones de tratamiento en dicho consenso la realización de varicocelectomía bajo las siguientes condiciones (64):

- ▶ La mujer es fértil o bien tiene una causa corregible de infertilidad.
- ▶ Ambos miembros de la pareja presentan esterilidad correctamente documentada.

- ▶ El varicocele es palpable o se puede demostrar por ecografía.
- ▶ El varón presenta uno o más parámetros seminales o alguno de los tests de función espermática alterados.

Se debe ofrecer la varicocelectomía a:

- ▶ Varones con seminograma alterado y varicocele palpable, aunque no estén intentando conseguir un embarazo en el momento de la visita. A varones con varicocele y seminograma normal se les debe aconsejar una visita de control con seminograma cada año o cada 2 años.
- ▶ Adolescentes con varicocele y disminución objetiva del volumen testicular se les debe ofrecer tratamiento. Y aquellos que presentan varicocele con tamaño testicular normal se les debe seguir anualmente con visita y medición del volumen testicular y/o seminograma.

Por otro lado, en las guías de la Asociación Europea de Urología se establecen como recomendaciones al tratamiento del varicocele (65):

- ▶ A pesar de que el tratamiento del varicocele en adolescentes puede ser efectivo, hay un riesgo significativo de sobre-tratamiento, ya que la mayoría de ellos no tendrán problemas posteriormente en su vida.
- ▶ La corrección del varicocele ha demostrado ser efectiva en varones con oligospermia, un varicocele clínico y sin otra causa que pueda explicar la infertilidad.

Así, se recomienda el tratamiento en los siguientes casos:

- ▶ Tratar a aquellos adolescentes que presenten reducción del volumen testicular ipsilateral y una evidente progresión de la disfunción testicular.
- ▶ No tratar varicoceles en varones infértiles que tengan un análisis del semen dentro de la normalidad.
- ▶ No tratar pacientes con varicocele subclínico.

- ▶ Tratar a varones con varicocele clínico, oligozoospermia y ausencia de otra causa que explique la infertilidad.

Como sintetizan Sharlip y cols, la evidencia clínica es cada vez más fuerte para demostrar que la varicocelectomía indicada correctamente puede mejorar el volumen testicular, mejorar los parámetros del seminograma y mejorar el dolor testicular (66) Una vez decidida la intervención, se puede realizar mediante un tratamiento quirúrgico o bien de Radiología intervencionista. El objetivo de todos los tratamientos será la ligadura u oclusión con la consecuente interrupción del flujo de la rama principal o ramas principales de la VEI para que el flujo venoso sea redirigido a las venas colaterales con ausencia de daño en sus válvulas.

El tratamiento mejor lo dará la técnica que logre mayor tasa de mejoría de la calidad seminal y conlleve mejores resultados en cuanto a la consecución de embarazos espontáneos llevados a término, a la vez que se relacione con una menor tasa de complicaciones derivadas del tratamiento (persistencia, recidiva, hidrocele, hematoma, infección o atrofia testicular).

1.7 Tipos de tratamiento

1.7.1 Procedimientos radiológicos

Se trata de realizar una oclusión selectiva de la VEI. El objetivo de esta oclusión radiológica es la detención del reflujo venoso de la vena espermática, dando lugar a la corrección del varicocele sin precisar de cirugía. Se debe realizar una flebografía previa al tratamiento para poder visualizar las numerosas variantes que existen en la anatomía del drenaje venoso del testículo. El conocimiento de dichas variantes anatómicas es fundamental para un diagnóstico correcto y para evaluar las diferentes opciones de tratamiento oclusivo que existen (67).

Figura 1.16: Flebografía pre y post tratamiento de embolización endovascular

*Se objetiva dilatación venosa en imagen de la izquierda y la presencia de “coils” post-embolización de vena gonádica izquierda en imagen de la derecha

Fuente: Fotografía cortesía del servicio de Radiología del Hospital Parc Taulí, Sabadell

La oclusión endovascular radiológica se describió a finales de los años 70 del pasado siglo. Sus orígenes se basan en estudios realizados por Ahlberg en 1965 quien sugirió ya en ese momento la relación entre varicocele y la presencia de flujo retrógrado en dirección a la VEI (25). Un año más tarde, el mismo Ahlberg publicó cómo utilizar la flebografía espermática con el objetivo de visualizar radiológicamente dicho reflujo (56). En momentos iniciales, la flebografía de la VEI fue usada para confirmar un diagnóstico de varicocele clínico (68), como exploración preoperatoria de la compleja anatomía de la vena espermática de cara a una correcta estrategia quirúrgica (69) o para diagnosticar una recidiva o una persistencia tras la realización de un tratamiento quirúrgico (70).

Al inicio de la técnica, se realizaba una inyección directa de soluciones hipertónicas en la VEI, lo que se denomina escleroterapia (71), para pasar posteriormente a la oclusión endovascular por medio de una embolización. Para dicha oclusión de la VEI se utilizaban materiales adhesivos, como el bucrilato o el isobutil-2-cianocrilato, espirales metálicas o “coils” o balones intravasculares desmontables.

Algunas veces, se realiza una combinación de embolización y escleroterapia, lo que se denomina técnica oclusiva mixta de cara al mayor éxito de la embolización. Dicho éxito depende de las variantes anatómicas y distribución venosa de las colaterales y del tronco principal de la VEI, que determina la posibilidad de oclusión con mejores resultados. Sin embargo, en ocasiones persiste un reflujo secundario a las propias colaterales que es muy difícil de localizar y que limita la técnica en ese sentido.

Se han descrito otras técnicas alternativas de oclusión endovascular, como son la electrocoagulación (72) y la oclusión térmica venosa por medio de contraste a gran temperatura pero ambas resultan muy dolorosas en su aplicación y precisan de gran cantidad de analgesia (73).

Normalmente la oclusión endovascular se realiza a través de un acceso femoral. Se utilizan asimismo accesos por vena yugular y vena basilica con relativa frecuencia. De manera más reciente, se ha utilizado la escleroterapia anterógrada de la VEI, en la cual, el acceso a la vena se realiza a través del escroto. Es una técnica que realiza un urólogo bajo anestesia local, y como agente esclerosante se utiliza normalmente el polidocanol (74).

Los procedimientos radiológicos para la oclusión de la VEI en el varicocele son tratamientos mínimamente invasivos, favoreciendo una rápida recuperación y pudiéndose realizar en muchos casos de manera ambulatoria, aunque existen críticas a su realización. Ésta depende de una correcta cateterización venosa, y tiene un elevado número de fracasos por culpa de la técnica. Además, el número de recidivas tras el tratamiento es similar a la cirugía abierta convencional, con una eficacia similar a largo plazo (75).

En cuanto a los resultados a nivel de fertilidad, oclusión endovascular y cirugía tienen las mismas tasas de embarazo espontáneo en los 12 meses posteriores al tratamiento (76). La escleroterapia anterógrada descrita más recientemente no ha mejorado dichas tasas de embarazo (77).

A día de hoy, las técnicas de oclusión endovascular radiológicas se consideran un tratamiento de primera elección cuando son realizadas por un radiólogo experimentado, dado que permiten una pronta recuperación a las actividades habituales en menos de 24 horas (78). Sin embargo, en la mayoría de hospitales, el tratamiento quirúrgico es la primera elección si se realiza por un urólogo con experiencia quirúrgica y se reserva en muchos centros la técnica de oclusión radiológica para los casos de recurrencia tras el tratamiento quirúrgico.

1.7.2 Procedimientos quirúrgicos

El tratamiento quirúrgico del varicocele consiste en la ligadura de la VEI y de las colaterales que estén dilatadas y es el tratamiento más frecuentemente utilizado (51).

El tratamiento tiene como objetivo evitar o tratar el daño progresivo que se produce en la función testicular, para lo cual se han planteado diversos abordajes quirúrgicos. En todos los abordajes, la idea es eliminar mediante ligadura quirúrgica el flujo ectásico de la vena espermática, preservando sin lesionar la arteria testicular, el conducto deferente y los vasos linfáticos del cordón espermático.

Los abordajes quirúrgicos descritos para el tratamiento quirúrgico del varicocele son los siguientes:

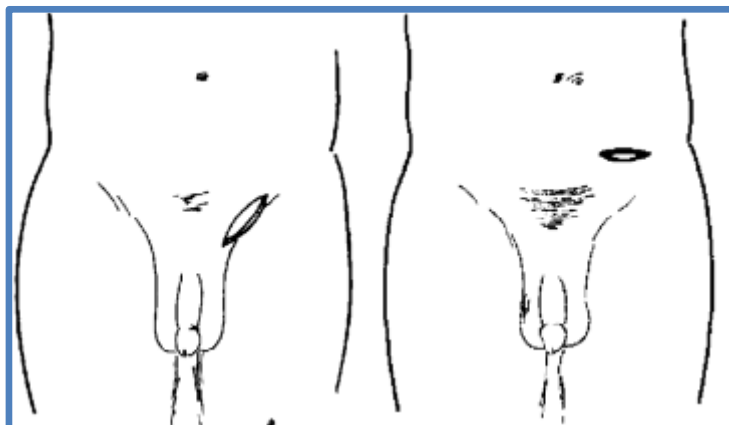
- ▶ Abordaje escrotal:

Mediante este abordaje, se intenta el acceso directamente sobre el plexo pampiniforme. Su principal problema está en la dificultad que existe por este acceso para identificar las pequeñas ramas que presenta en este punto la arteria testicular. Por este motivo, es una técnica que presenta un riesgo elevado de atrofia testicular, con lo que generalmente ha sido rechazada y no se suele utilizar (59).

- ▶ Abordaje inguinal:

Es una técnica descrita en 1918 por Ivanissevich (79). Se accede a nivel del conducto inguinal, donde se realiza la ligadura de la vena espermática (normalmente bifurcada a este nivel) y de las venas colaterales. Esa bifurcación ya presente a dicho nivel, hace que pueda quedar alguna rama sin ligar, aumentando levemente el riesgo de recidiva. Posteriormente se han propuesto modificaciones a la técnica original descritas por Ribeiro (80), Buntz (81) y Jimenez Cruz (82).

Figura 1.17: Esquema abordaje subinguinal en la imagen izquierda, e inguinal en la imagen derecha



Fuente: vasovaso.com/cirugías/varicocele

▶ Abordaje subinguinal:

En este acceso, se elimina la necesidad de abrir la aponeurosis del músculo oblicuo mayor (y el riesgo de herniación que conlleva). En este punto el riesgo de lesión arterial es levemente mayor dado que la arteria testicular se encuentra bifurcada y el número de venas es mayor, con el riesgo de dejar alguna rama varicosa sin ligar. En caso de pacientes obesos o con cirugía inguinal previa, esta sería la vía de elección junto a la incisión inguino-escrotal de Bernardi (83).

▶ Abordaje retroperitoneal:

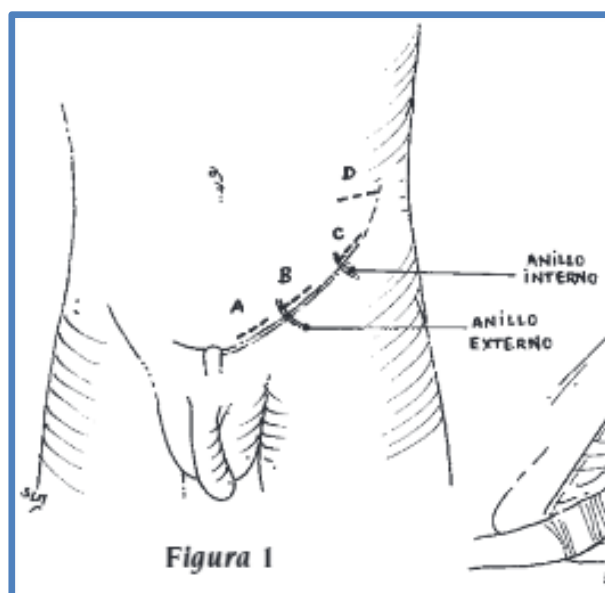
Es una técnica descrita por Palomo en 1949 (85). La incisión se realiza superiormente al anillo inguinal interno. En su origen, se realizaba la ligadura en bloque de arteria y vena espermáticas, dado que a esta altura, la irrigación del testículo puede suplirse con la vascularización cremastérica y deferencial. Más recientemente, Atasi y cols han modificado la técnica en la que se realiza la ligadura de la vena espermática sin ligar la arteria, presentando mejores resultados (*Ver Figura 1.18*) (86).

▶ Abordaje laparoscópico:

Se trata de una técnica por la que se accede al espacio retroperitoneal gracias a la distensión gaseosa del laparoscopio y que permite, gracias a la magnificación que proporciona el laparoscopio, visualizar la arteria testicular y en algunos casos también

los vasos linfáticos. Ofrece las ventajas de la mejor visualización de las estructuras y de la cirugía mínimamente invasiva (*Ver Figuras 1.19 y 1.20*). Por otro lado, no ofrece ventajas frente a la cirugía abierta en cuanto a la estancia hospitalaria, necesidad de analgesia o calidad de vida frente a la cirugía abierta. Sin embargo, precisa de un tiempo de cirugía mayor y requiere de anestesia general con las complicaciones que conlleva, hecho que limita esta técnica y no se suele utilizar como rutina en el tratamiento quirúrgico del varicocele. En cirujanos entrenados, puede ser una buena alternativa en la corrección de varicoceles bilaterales (87).

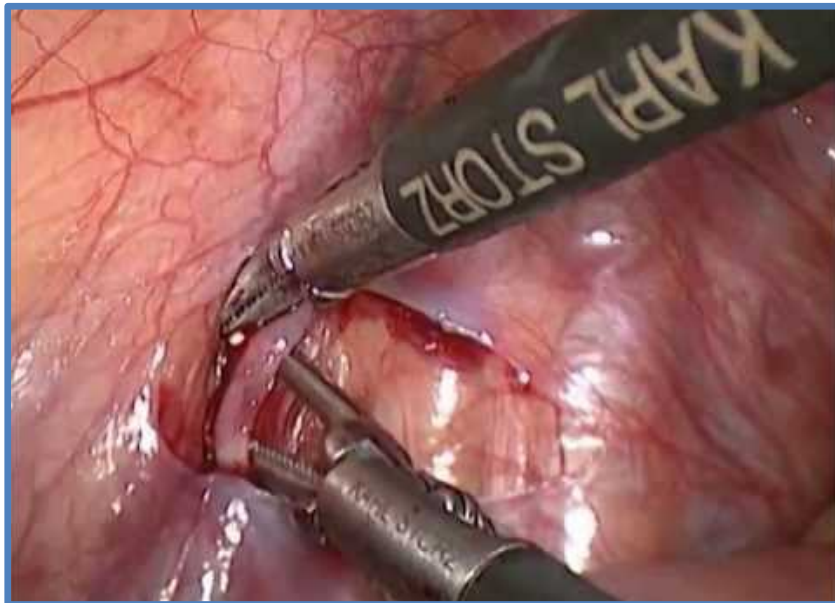
Figura 1.18: Diferentes accesos para varicocelectomía



*A: subinguinal (Bernardi); B: Inguinal bajo (Buntz-Jiménez-Cruz); C: Inguinal alto (Ivanissevich); D: Retroperitoneal (Palomo)

Fuente: Atlas quirúrgico de Urología práctica, Budia A, et al (2009) (84)

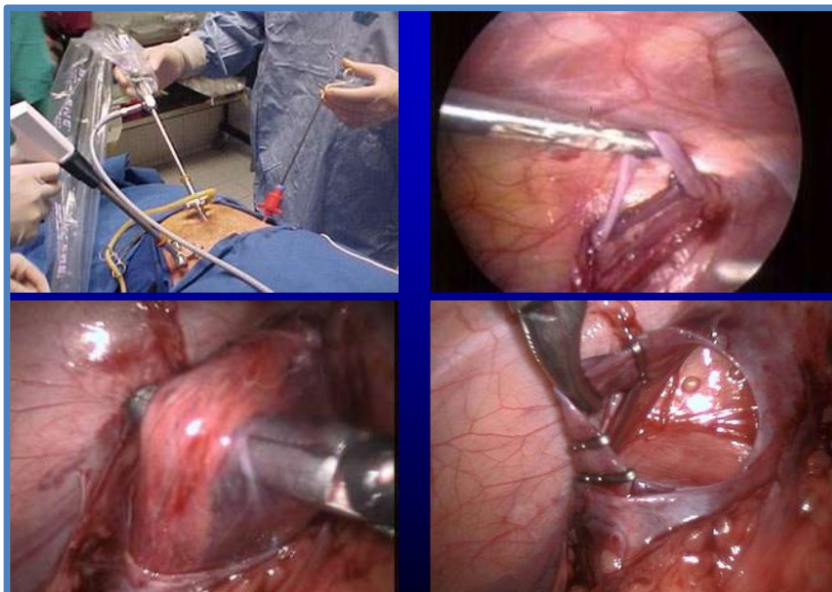
Figura 1.19: Detalle de técnica de varicocelectomía



*Obsérvese la disección de la vena ectásica desde un acceso intraperitoneal

Fuente: laparoscopyhospital.com

Figura 1.20: Diferentes detalles de técnica de varicocelectomía laparoscópica



Fuente: laparoscopyhospital.com

▶ Abordaje microquirúrgico:

La técnica fue descrita por primera vez por Maymar en 1994 (88). Se utiliza generalmente la vía subinguinal, y se añaden unas lentes de magnificación y material específico para microcirugía (Ver Figuras 2.21, 2.22 y 2.23). El objetivo es la ligadura de la VEI pero con la correcta visualización de la propia arteria espermática y de manera más sencilla identificar y preservar los vasos linfáticos, disminuyendo el riesgo de hidrocele postoperatorio. Una vez finalizada la disección, únicamente deben quedar sin ligar la arteria cremastérica, la arteria espermática, el conducto deferente y los vasos linfáticos. Dado que el conducto deferente se acompaña por dos grupos de vasos, mientras uno de esos grupos permanezca intacto, el retorno venoso testicular será el adecuado (89).

Varios estudios han comparado los diferentes abordajes de tratamiento quirúrgico del varicocele. En un meta-análisis relativamente reciente se concluyó que la técnica de microvaricocelectomía por vía subinguinal dio lugar a mejores resultados que la cirugía convencional, en base a menor número de recidivas, menos cantidad de hidroceles secundarios y mejores tasas en cuanto a embarazo espontáneo (90). El resto de técnicas alternativas son todas aceptables, dado que sus resultados son superponibles (90).

A continuación, se muestran varias ilustraciones correspondientes a la técnica de varicocelectomía microquirúrgica. Todas ellas realizadas en el Hospital Universitario Parc Taulí, Sabadell.

Figura 1.21: Detalle de acceso y colocación de microscopio quirúrgico



Fuente: Fotografía cortesía del Hospital Parc Taulí, Sabadell

Figura 1.22: Detalle quirúrgico de vena dilatada de plexo venoso espermiático interno



*Obsérvese el cordón espermiático aislado en su totalidad, disecado por un separados Farabeuf y cómo la vena dilatada destaca como una estructura tubular azulada

Fuente: Fotografía cortesía del Hospital Parc Taulí, Sabadell

Figura 1.23: Detalle quirúrgico de ligadura de vena dilatada del complejo venoso espermatático interno



*Obsérvese la vena, anteriormente descrita, seccionada por la mitad, como dos estructuras tubulares. Una de ellas cogida por una pinza hemostática y siendo obstruida por una ligadura de seda

Fuente: Fotografía cortesía del Hospital Parc Taulí, Sabadell

Se han descrito además anastomosis microquirúrgicas con la vena safena o la vena espermatático-epigástrica con el objetivo de general una vía alternativa para el retorno del flujo de las venas del plexo pampiniforme, al conectar con un sistema de más baja presión (91).

1.7.2.1 Complicaciones de las técnicas quirúrgicas

Cada técnica quirúrgica de las descritas tiene complicaciones, algunas derivadas del tipo de abordaje, otras de la técnica anestésica que se precisa. Los diferentes estudios que han analizado las tasas de éxito y complicaciones de las técnicas quirúrgicas, analizan principalmente 4 ítems. La posibilidad de preservación arterial, la aparición de hidrocele postoperatorio, la aparición de recidivas y la morbilidad derivada de la técnica. En el conjunto de estudios, como se resume en el tratado de Andrología y Medicina Sexual del Dr. Cruz, la técnica con mejores resultados, menor morbilidad e hidrocele y mayores tasas de preservación arterial es la varicocelectomía microquirúrgica (*Ver Tabla 2.1*).

Tabla 1.2: Complicaciones y recurrencias según las distintas técnica de tratamiento utilizadas (promedio de diversos estudios)

Técnica	Preservación arterial	Hidrocele (%)	Recidiva	Morbilidad
Retroperitoneal (Palomo)	No	8,24	14,97	No
Inguinal (Ivanissevich)	No	7,30	2,63	No
Laparoscópica	No	2,84	4,30	Sí
Radiológica (embolización)	Sí	0	12,70	Sí
Microquirúrgica	Sí	0,44	1,05	No

Fuente: Elaboración propia a partir de Cruz N. (2012) (51)

1.8 Tratamiento del varicocele y su influencia en la fertilidad

1.8.1 Efectos fisiopatológicos

1. Efecto sobre la función de las células de Sertoli:

En pacientes afectados de varicocele se puede observar una detención de la maduración con déficits en la unión de las espermátides produciendo secundariamente alteraciones en la espermatogénesis. Tras el tratamiento, se objetiva una restauración de la correcta maduración de las espermátides (92).

2. Efecto sobre las células de Leydig:

Al alterarse la función de las células de Sertoli se produce un aumento de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la Luteoestimulante (LH). Esto sugiere una alteración en la correcta función de las células de Leydig con menor producción de testosterona por estímulo de la hormona gonadotropina coriónica humana (HCG) (93). Tras el tratamiento, los niveles de testosterona se normalizan en un plazo aproximado de tres meses (94).

3. Efecto sobre la perfusión testicular:

La perfusión arterial del testículo en la mayoría de los casos queda restaurada a las 24h del tratamiento de varicocele. Este hecho apoya la hipótesis de que el defecto de perfusión testicular puede deberse a vasoconstricción reversible. Cuando no se da esa restauración de la perfusión, podría deberse más a alteraciones anatómicas (95).

1.8.2 Efectos sobre los parámetros seminales

Según los estudios analizados en el meta-análisis de Cayan y cols, el efecto de la varicolectomía es la mejoría significativa de los parámetros seminales, incluyendo concentración espermática (número total de espermatozoides), movilidad y recuento total de espermatozoides móviles. La mejoría de los parámetros seminales se puede dar en todos los ítems comentados, o el alguno de ellos de manera aislada (90). El beneficio es posible tanto en oligozoospermia moderada como en los pacientes con oligozoospermia severa o incluso azoospermia (96).

1.8.3 Efectos sobre la fertilidad

Se considera que el mejor indicador para valorar la eficacia de un tratamiento para la infertilidad es el embarazo. En el meta-análisis de Cayan y cols se analizan las diferentes técnicas de tratamiento del varicocele en cuanto a la consecución de embarazo espontáneo. Los porcentajes son 41,97% de embarazos tras un tratamiento con varicolectomía microquirúrgica, 37,69% en la técnica retroperitoneal de Palomo, 36% en la técnica inguinal (Ivanissevich), 33,2% en embolización radiológica y 30,07% en la técnica laparoscópica. Estos resultados se han criticado por la falta de uniformidad en el intervalo de análisis post-tratamiento, y por la falta de consenso en cuanto a la uniformidad de las parejas por la influencia que pueda tener el factor femenino (90).

A pesar de las críticas que alguna vez ha generado el tratamiento del varicocele, parece adecuado ofrecer a pacientes con varicocele y alteraciones en la calidad seminal la ligadura quirúrgica u oclusión radiológica del varicocele. Posiblemente sean necesarios estudios

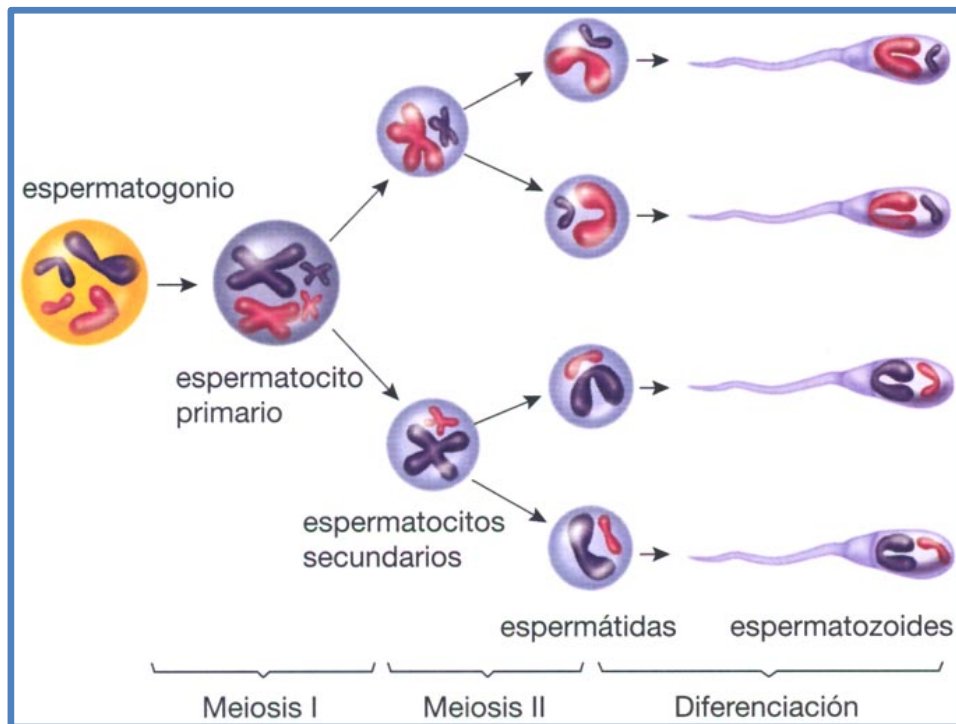
multicéntricos, prospectivos y con criterios uniformes para finalmente poder valorar objetivamente el efecto del tratamiento del varicocele sobre la fertilidad.

1.9 La espermatogénesis

En el interior de los testículos se encuentran los túbulos seminíferos, unos conductos de longitud aproximada de 30-60cm y diámetro de 0,2mm, conteniéndose alrededor de mil túbulos en los dos testículos. En el epitelio de estos túbulos, 8 asientan las espermatogonias o células germinativas y es donde se inicia la espermatogénesis, que es la generación de espermatozoides a partir de dichas células, por medio de procesos de mitosis y meiosis en el parénquima testicular. Este mecanismo se activa por la estimulación de la hormona GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) que es liberada en el hipotálamo. La maduración final de espermatozoides tiene lugar en el epidídimo. Los espermatozoides son las células reproductoras masculinas, su objetivo es la fecundación del óvulo femenino. Tienen una longitud aproximada de 10 a 60 micras y se compone de una cabeza donde se localiza el material cromosómico y de un flagelo o cola con función de propulsor.

En la especie humana, el proceso de la espermatogénesis dura de 62 a 75 días y tiene lugar en tres etapas: espermatocitogénesis o mitosis, meiosis y espermatohistogénesis o espermiogénesis (*Ver Figura 1.24*). Dependiendo de la fase del proceso, las células serán de dotación diploide ($2n$), correspondientes a espermatogonias y espermatocitos primarios, o bien tendrán una dotación haploide (n) como son las espermátidas, los espermatocitos secundarios y los espermatozoides (97).

Figura 1.24: Espermatogénesis



Fuente: wordpress.com

1.9.1 Espermatogénesis o espermatocitogénesis

Los espermatozoides son un tipo de célula especial, considerados haploides (n) que poseen la mitad de cromosomas que las células somáticas. La reducción de sus cromosomas se produce mediante una peculiar división celular, la meiosis. En ella, la célula diploide ($2n$) sufrirá dos divisiones sucesivas sin el paso de duplicación de su ADN, así se tendrá la capacidad de dar lugar a cuatro células haploides.

Existen hasta 6 diferencias importantes que hacen que la meiosis sea diferente entre mamíferos machos y hembras. Es exclusivo del género masculino:

- ▶ Inicio de la meiosis continuamente a partir de células madre.
- ▶ Producción de cuatro gametos en cada ciclo (solo uno en la ovogénesis).
- ▶ La meiosis se completa en 22 días.

- ▶ La diferenciación y meiosis se producen de manera continua sin bloqueos al ciclo celular.
- ▶ La diferenciación de los gametos tiene lugar a través de un precursor haploide (espermátida) tras el fin de la meiosis.

La espermatogénesis se produce de manera sincronizada, multiplicándose a la vez las células indiferenciadas en los túbulos seminíferos. Esta sincronización se produce gracias a puentes de citoplasma existentes entre las células indiferenciadas que permiten el desarrollo simultáneo de las células de cada tubo seminífero.

Dichas células germinales darán lugar a las células madre de los espermatogonios, que tras su división, darán lugar a los espermatocitos primarios.

Existen 2 tipos de espermatogonias según el tipo de mitosis que vayan a experimentar:

- ▶ Espermatogonias tipo A: aquellas que tras la mitosis pasarán a diferenciarse en espermatocitos primarios.
- ▶ Espermatogonias tipo B: aquellas que tras la mitosis darán lugar a más células de su propio tipo, renovándose de este modo la producción de nuevas espermatogonias de tipo A y B perpetuando la producción de ambas mediante un bucle de división.

En líneas generales, la espermatogénesis es un proceso que dura aproximadamente 3 meses y que consta de 4 etapas principales:

1. Proliferación: multiplicación de células germinales por mitosis con resultado de espermatogonias. 2 semanas de duración.
2. Crecimiento: Paso de espermatogonias de tipo A a espermatocito primario o aumento en tamaño y número de espermatogonias tipo B para transformarse en espermatocitos primarios.
3. Maduración: primera división meiótica del espermatocito primario que pasa a espermatocito secundario (ya haploide) y posteriormente una segunda división

meiótica surgiendo como resultado dos esperáticas. Fase 2 y 3 corresponden a la meiosis y su duración es de 22 días.

4. Espermiogénesis: paso de esperáticas a espermatozoides. 33 días de duración.

Este tipo de células se reconocen de manera sencilla al microscopio, dado que tienen grandes núcleos, abundante citoplasma y puentes citoplasmáticos que permiten su división en bloque, puentes que solo se van a romper cuando los espermatozoides sean liberados a la luz del túbulo seminífero.

1.9.2 Espermiogénesis o espermiogénesis

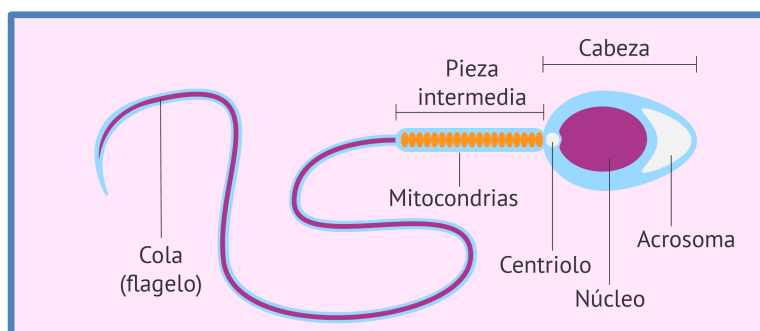
Se trata de un proceso de maduración final en el que las esperáticas evolucionarán a espermatozoides. Para que tenga lugar se producen una serie de procesos, como son la reducción del citoplasma, se alarga en núcleo celular y queda en la cabeza del espermatozoide, dando lugar a su forma puntiaguda y finalmente se desarrolla el flagelo que le permitirá el movimiento. Esta es la última fase de la espermatogénesis, y se compone de cuatro fases sincrónicas:

- ▶ Reducción del citoplasma: las células de Sertoli fagocitan el citoplasma de la esperática o bien se pierde en el interior de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli además, ejercerán de barrera hematotesticular impidiendo el paso de células inmunogénicas.
- ▶ Condensación del núcleo: aumenta su densidad, disminuye su tamaño y queda en forma aplastada. Se compacta el ADN por la acción de las protaminas.
- ▶ Formación del acrosoma: se sitúa en el extremo apical del futuro espermatozoide y posee dos membranas, interna y externa. Se trata de un lisosoma súper especializado que contiene hialuronidasa, enzima que degrada el ácido hialurónico presente en las células de la granulosa que rodean al ovocito, para así disgregar dichas capas celulares en un proceso denominado decumulación, que le permite acceder al ovocito maduro para fecundarlo.

- ▶ **Formación del flagelo:** se trata de un cilindro con 9 microtúbulos dobles rodeando a dos centrales únicos, se desarrolla a partir del centriolo distal. Se compone del cuello, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza final, completando una forma de cola característica. Los propios centriolos tienen un papel fundamental en la fecundación, dado que el correcto posicionamiento de los cromosomas materno y paterno en las primeras divisiones del cigoto dependen de los centriolos. En caso de inestabilidad o ausencia de los mismos, se generarán alteraciones cromosómicas, conllevando consigo la presencia de aneuploidías.

De este modo, los espermatozoides se estructuran en tres partes bien caracterizadas: cabeza, cuello y cola (*Ver Figura 1.25*). La cabeza es la parte de mayor tamaño, contiene el material genético de la herencia en los cromosomas y presenta en la parte anterior el acrosoma, cuyo objetivo es perforar las envolturas del ovocito. El cuello se estructura con el centrosoma y las mitocondrias y el flagelo, se forma formado a partir de los centriolos, siendo es el filamento que genera motilidad para que el espermatozoide pueda desplazarse hasta el óvulo y para así fecundarlo.

Figura 1.25: Esquema de espermatozoide maduro



Fuente: reproducciónasistida.org

El ciclo completo de la espermatogénesis dura aproximadamente 2-3 meses. La mitosis de las espermatogonias dura unos 16 días, con resultado de espermatocitos primarios. Estos en 24 días completan la primera meiosis para dar lugar a espermatocitos secundarios, que en horas van a pasar a convertirse en espermátidas. La diferenciación de las espermátidas a espermatozoides dura unos 24-33 días. Esta diferenciación se da en el interior de los testículos en un proceso denominado “spermatogenic wave” u oleada espermatogénica. En

ella los espermatozoides adquieren progresivamente diferentes grados de maduración, pero lo hacen por oleadas, por grupos que se encuentran en la misma fase de la maduración. Cuando salen del testículo, permanecen en el epidídimo para finalizar con la maduración y activar su correcta movilidad. Al finalizar la maduración, los espermatozoides maduros se acumulan en el conducto deferente y las vesículas seminales, donde se almacenan hasta la eyaculación. Todo el proceso sumado, dura aproximadamente 64 días, en los cuales se produce el al paso desde el estado de espermatogonias a espermatozoides. Se añaden 2 semanas a dicho proceso por el paso de los espermatozoides por a través del epidídimo (98).

1.9.3 Regulación hormonal

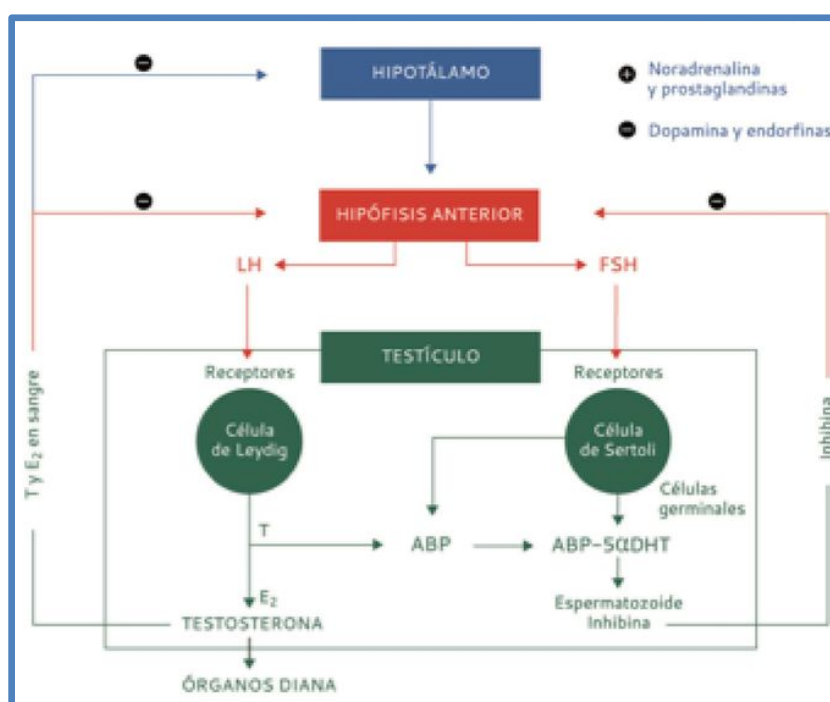
Tiene lugar por medio del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (22). El control del mismo se realiza por un proceso de retroalimentación negativa, siendo la hormona sintetizada por el tejido diana la que inhibe la síntesis y liberación de las hormonas iniciales o intermedias. Las hormonas que se encargan del control de la espermatogénesis son las siguientes (*Ver Figura 1.26*) (22):

- ▶ **GnRH**: hormona liberadora de gonadotropinas. Se secreta en el hipotálamo y actúa en la hipófisis estimulando la liberación gonadotropinas LH y FSH.
- ▶ **FSH**: hormona estimulante de folículos. Secretada por la hipófisis, actúa sobre las células de Sertoli para que se produzca la hormona inhibina y sobre los túbulos seminíferos para que se estimule la producción de espermatozoides. En el género femenino esta hormona desencadena el correcto crecimiento del folículo.
- ▶ **LH**: hormona luteinizante. Se secreta por la hipófisis y actúa sobre las células de Leydig para que secreten testosterona. En el género femenino actúa sobre el cuerpo lúteo para que se produzca la progesterona.
- ▶ **Testosterona**: sintetizada por las células de Leydig de manera pulsátil gracias al estímulo de la LH. Se secreta además en la corteza suprarrenal (en menor cantidad). En mujeres se secreta pero en mínimas cantidades. Por medio del proceso de

retroalimentación negativa, inhibe la síntesis de GnRH del hipotálamo y de LH y FSH de la hipófisis.

- ▶ **Estrógenos:** se forman a partir de la testosterona gracias a la acción de las aromatasas presentes en las células de Sertoli cuando éstas son estimuladas por la FSH.
- ▶ **Inhibina:** se libera por las células de Sertoli en respuesta al estímulo de la FSH. Por retroalimentación negativa, inhibe la liberación de LH y FSH de la hipófisis.
- ▶ **GH:** hormona del crecimiento. Necesaria para el control de las funciones metabólicas esenciales de los testículos. Fomenta la división precoz de las espermatogonias. Cuando se encuentra ausente, la espermatogénesis es claramente deficiente, dando lugar a alteraciones en la fertilidad.

Figura 1.26: Esquema de regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testicular



Fuente: [slideshare.es](https://www.slideshare.es)

1.10 Fragmentación del ADN espermático

1.10.1 Generalidades

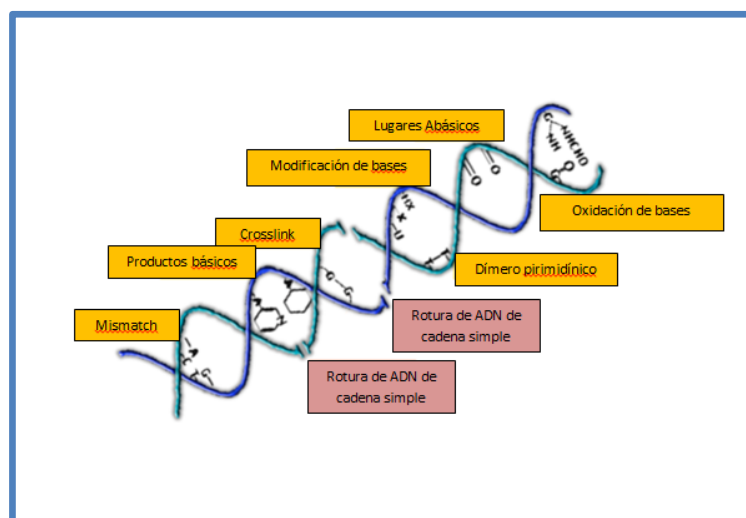
1.10.1.1 ADN espermático

Como en cualquier célula eucariota, el espermatozoide contiene dos tipos de ADN: el ADN mitocondrial y el ADN nuclear. Mientras el ADN mitocondrial espermático ha sido escasamente estudiado desde el punto de vista de la fertilidad, el ADN nuclear parece tener una clara implicación en la formación del cigoto (99). Así pues, diversas alteraciones en la fertilidad y fallos en varios tratamientos de reproducción asistida se han relacionado con una deficiente integridad del ADN nuclear espermático (100).

1.10.1.2 Definición

La fragmentación de ADN espermático (*Ver Figura 1.27*) se podría definir como cualquier alteración: ya sea en forma de roturas de la doble hélice de ADN, pudiendo ser roturas de cadena simple o de doble cadena, así como todas aquellos trastornos que den lugar a modificaciones de las bases nitrogenadas, oxidación de las bases nitrogenadas, formación de lugares abásicos o aductos o fenómenos de entrecruzado (*cross-link*) entre ADN y proteínas o entre ADN y ADN, pudiendo producir la formación de nuevas roturas de la doble hélice de ADN espermático (101).

Figura 1.27: Posibles alteraciones con potencial para producir roturas del ADN espermático



Fuente: Elaboración propia

El análisis de la fragmentación del ADN espermático ha adquirido progresivamente mayor importancia en el estudio del factor masculino en las alteraciones de la fertilidad. Últimamente se han ido incorporando al arsenal diagnóstico varios tests para la evaluación de la integridad del ADN espermático. Los valores de normalidad descritos dependen de cada una de las metodologías utilizadas, dado que puede haber diferencias en la sensibilidad de los distintos métodos (102). En cualquier caso un porcentaje incrementado de espermatozoides con ADN fragmentado dan como resultado unas peores tasas de embarazo (102).

Hoy día, la evaluación de la integridad del ADN espermático todavía no se considera de rutina en el estudio del factor masculino en infertilidad, no reflejándose en las principales guías de urología (103). Sin embargo, parece claro que la evaluación de la integridad del ADN espermático se está consolidando como una herramienta eficaz y realizable en los laboratorios especializados en andrología, que, añadido al seminograma tradicional, es de gran utilidad en el estudio de la calidad espermática y su potencial fértil. Hay que tener en cuenta el potencial de reparación del ADN que tiene el propio cigoto, hecho que puede interferir en el diagnóstico de alteraciones del ADN espermático y es capaz de reparar algunas de las alteraciones anteriormente descritas (104).

Existe consenso sobre la decisión de a qué paciente ofrecer el estudio de la fragmentación de ADN espermático y se han establecido cuatro grupos de pacientes a los que se recomendaría dicho estudio en caso de infertilidad (102):

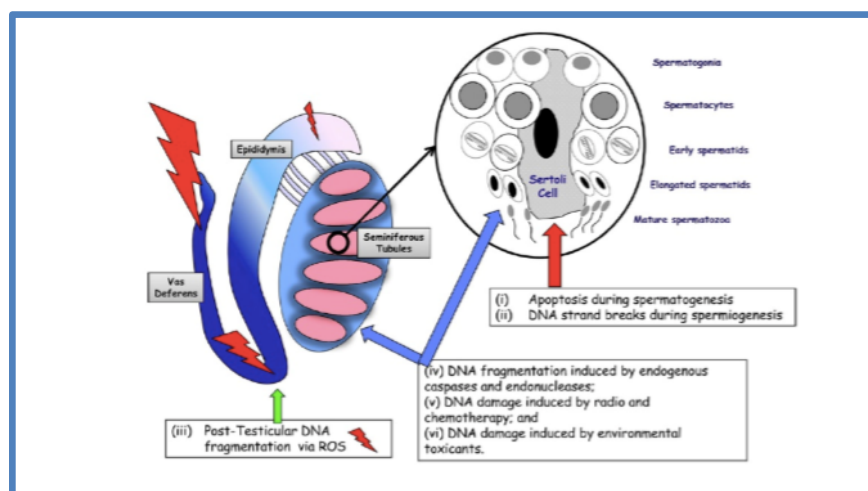
1. Varicocele clínico.
2. Infertilidad inexplicada, abortos de repetición o fallos en inseminación intrauterina.
3. Fallo en la inseminación de ovocitos o ICSI (*IntraCytoplasmatic Sperm Injection*).
4. Espermiograma normal o en el límite de normalidad junto a factores de riesgo.

Será importante tener en cuenta estas recomendaciones para saber qué pacientes y en qué tipo de alteraciones del ADN espermático será óptimo el tratamiento y determinar así qué pacientes se podrán beneficiar del mismo.

1.10.2 Etiología de la fragmentación del ADN espermático

El daño en el ADN espermático se puede producir en cualquier punto del proceso de la espermatogénesis (105). Y este proceso de fragmentación del ADN espermático puede tener su origen en un conjunto de diversos factores que pueden actuar de manera aislada, o más habitualmente de manera combinada pudiendo influir unos sobre otros (106). Estos factores pueden ser intrínsecos, como pueden ser las alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina del ADN, la alteración producida por un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el consecuente estrés oxidativo, y defectos en la apoptosis o proceso de activación de las nucleasas (*apoptosis-like*) (107). Por otro lado, existen factores extrínsecos que pueden influir en la fragmentación del ADN espermático, como pueden ser hábitos o estilo de vida, exposición a factores tóxicos medioambientales, inflamaciones o infecciones y el efecto de radiaciones electromagnéticas o quimioterapia (108). Estas alteraciones se pueden producir tanto a nivel de la espermatogénesis en el testículo, como en la producción de espermatozoides en el epidídimo, en el conducto deferente o en el propio eyaculado (*Ver Figura 1.28*) (48).

Figura 1.28: Esquema de etiologías del daño del ADN espermático en tres posibles niveles: testicular, epididimario y a nivel del conducto deferente



Fuente: Sakkas D y Cols (2010) (107)

A continuación se describen los agentes más relevantes implicados en el desarrollo de roturas en la cadena de ADN espermático.

1. Apoptosis o pseudoapoptosis:

Una gran parte de las células somáticas y de las células germinales que se producen diariamente en el cuerpo humano, mueren por apoptosis (109). Este hecho es aplicable a las células germinales y supone un paso esencial para la correcta progresión de la espermatogénesis, eliminándose por este método las células meióticas o post-meióticas alteradas, favoreciendo el control de calidad del que precisa la producción de espermatozoides por el testículo (110).

En este proceso de eliminación de células germinales alteradas, destaca el papel del sistema Fas/FasL. Las células destinadas a ser eliminadas expresan el marcador Fas en su membrana. Por otro lado, las células de Sertoli expresan el ligando FasL. La unión del marcador Fas al ligando FasL provocará la fagocitosis de las células apoptóticas por las células de Sertoli (111). Cuando este mecanismo de control no funciona correctamente, se pueden encontrar en semen espermatozoides con expresión de Fas en su membrana. Sakkas y cols sugirieron que esto puede ser debido a una saturación de la capacidad fagocitadora de las células de Sertoli o por alguna alteración del sistema Fas/

FasL, hipótesis conocida como “apoptosis abortiva”, de la cual no se conoce el mecanismo molecular por el que el espermatozoide positivo para Fas escapa del control (112). Aunque la apoptosis abortiva no se ha podido relacionar directamente con la fragmentación del ADN espermático y la consecuente alteración en la fertilidad, sí que se relacionaría con la vía intrínseca de la fragmentación de ADN espermático, en la que el estrés oxidativo mitocondrial daría lugar a la activación de las caspasas y, posteriormente las caspasas activarían a las nucleasas de espermatozoide para digerir aquellas regiones accesibles de ADN.

2. Estrés oxidativo:

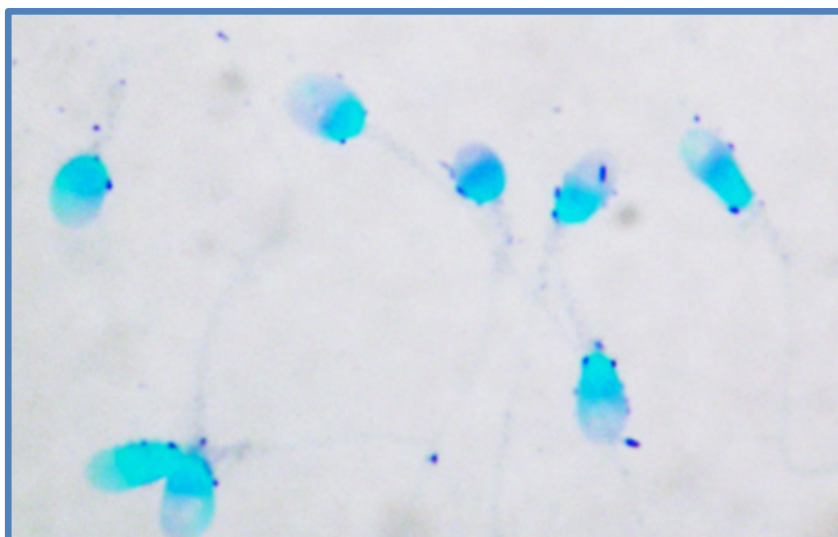
La producción excesiva y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) es una de las causas principales de fragmentación del ADN espermático (113). Varios estudios han descrito que los varones infértiles presentan altas concentraciones en semen de ERO (46) (114).

Las ERO son producidas principalmente por los procesos de respiración celular que se dan en las mitocondrias de la pieza intermedia del espermatozoide al generar el Adenosin Trifosfato (ATP) necesario para el movimiento del flagelo. Los niveles basales adecuados de ERO son fundamentales para determinadas funciones celulares, principalmente para los procesos de capacitación y de la reacción acrosómica (115). Los agentes oxidantes y antioxidantes se encuentran en condiciones normales en equilibrio, regulados por el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa. Gracias a la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido por la glutatión reductasa, el glutatión reducido lo utiliza la glutatión peroxidasa para reducir lipoperóxidos y peróxidos, y así reducir los niveles de ERO. Cuando existe un desequilibrio en forma de aumento de las ERO, se podría producir la peroxidación de la membrana plasmática y comprometer la integridad del ADN espermático, condición que se denomina “estrés oxidativo” (*Ver Figura 1.29*) (116).

El estrés oxidativo puede provocar diferentes tipos de daño en el ADN espermático, como son la pérdida de una base nitrogenada para crear un lugar abásico, las modificaciones de las bases, los fenómenos de entrecruzamiento (“*crosslink*”) entre las

propias cadenas de ADN o entre ADN y proteínas (115), roturas de las cadenas de ADN tanto de cadena doble como de cadena simple o por la hidroxilación de la guanina, creando una base llamada 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG), uno de los marcadores más abundantes y sencillos del daño en el ADN espermático producido por el estrés oxidativo. La presencia de 8-OHdG en cantidades elevadas, se ha relacionado directamente con la infertilidad masculina y se ha utilizado incluso como marcador del daño en el ADN debido al estrés oxidativo (106).

Figura 1.29: Detección de especies reactivas de oxígeno mediante precipitación de sales de tetrazolio



*Los puntos azul intenso indican el lugar de precipitación o presencia de ERO

Fuente: Agustín García-Peiró

El efecto del estrés oxidativo está condicionado tanto por la capacidad antioxidante del propio espermatozoide como del líquido seminal. Esta capacidad antioxidante se relaciona básicamente con la presencia de ácido ascórbico o vitamina C (117), carnitinas (118) y la coenzima Q-10 (119). La presencia de estos antioxidantes en mayor o menor medida se ha relacionado con la fertilidad masculina (120).

El efecto antioxidante de estos componentes se ha estudiado de diversas formas y ha sido motivo de creación de complementos alimentarios ricos en vitamina C, carnitina y coenzima Q10, disminuyendo el estrés oxidativo en semen y mejorando la calidad de

los parámetros seminales en pacientes infértiles (121) (122), con la consecuente posible mejora en las expectativas reproductivas del individuo.

3. Alteraciones en el empaquetamiento del ADN:

Durante el proceso de la espermatogénesis, las espermátidas sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que llevan a su elongación. Así, va adquiriendo progresivamente características propias morfológicamente. Los cambios más importantes se dan a nivel de la morfología nuclear, donde con el objetivo de proteger de agresiones externas al genoma paterno, se produce una condensación de la cromatina, resultando en una compactación muy elevada del ADN espermático (123). Esta condensación de la cromatina se da en dos fases:

- ▶ **Fase testicular:** en la que las histonas son sustituidas por proteínas de transición y posteriormente por protaminas que hacen que las cadenas de ADN puedan estructurarse en forma toroidal (o de “donut”).
- ▶ **Fase epididimaria:** en la que se establecen entre las propias protaminas puentes disulfuro, cuya consecuencia es una compactación firme del ADN espermático (124).

Este elevado estado de compactación de la cromatina es clave para la protección del ADN espermático de agentes externos susceptibles de producir roturas. Alteraciones en el proceso de empaquetamiento darán lugar a un núcleo pobremente compactado y susceptible de lesiones en el ADN. Por ejemplo, se ha demostrado una menor compactación nuclear y una menor integridad del ADN nuclear en el estudio de pacientes infértiles con varicocele (125).

Por otro lado, la presencia de una baja cantidad de protaminas y una alteración en la relación entre protamina 1 y protamina 2 (P1/P2 ratio), dará lugar a una maduración espermática incompleta y se ha correlacionado con alteraciones cromosómicas y fragmentación de ADN espermático (126) y con una capacidad menor de conseguir una fertilización mediante los procedimientos de Fecundación *In Vitro* (FIV) e ICSI. (127).

4. Actividad de endonucleasas y caspasas:

Los espermatozoides de algunas especies poseen la capacidad de internalizar segmentos de ADN exógeno, hecho que activa a las enzimas endonucleasas, pudiendo dañar el propio ADN espermático y activando las caspasas hasta producir la apoptosis de la célula germinal (128). Este mismo proceso puede estar presente en el ser humano, e incluso de manera más severa, dado que el ADN humano está menos compactado al tener una mayor cantidad de histonas (129).

Estas nucleasas pueden ser endógenas del propio espermatozoide o bien exógenas presentes en el líquido seminal. Dichas nucleasas del semen podrían ser internalizadas por el espermatozoide dando lugar a roturas en el ADN espermático, provocando una disminución de la capacidad fértil (130).

5. Inflamaciones e infecciones:

Las infecciones son una de las principales causas de infertilidad corregible. Se estima que puede estar presente hasta en el 35% de pacientes en las consultas de infertilidad (131).

Generalmente, las infecciones del tracto genital masculino se acompañan de inflamaciones y, consecuentemente, una activación de leucocitos y su trasvase al líquido seminal (132).

El incremento de leucocitos da lugar a un incremento del estrés oxidativo con las consecuentes alteraciones en el ADN espermático anteriormente descritas. A esto hay que añadir el daño que produce la acción directa de los propios patógenos, que suele producir una disminución en la movilidad espermática (133).

En muchos de estos casos se supone que el tratamiento con antibióticos podrá combatir la infección y mejorar los valores de estrés oxidativo producido por la leucocitospermia, de ahí que se considere una causa reversible de infertilidad masculina.

6. Exposición a agentes tóxicos:

La exposición a tóxicos de varios tipos se ha asociado a alteraciones en la fertilidad. Ya en 1990, Wilkins y Hundley demostraron la influencia negativa en parámetros del seminograma como la motilidad, la concentración o la fragmentación del ADN espermático, de sustancias químicas como disolventes, metales pesados, sustancias de diferentes industrias químicas, resinas fenólicas, pinturas o gasolina (134).

Más recientemente, se ha estudiado el efecto de la exposición a insecticidas o a pesticidas organofosforados resultando en un aumento de la fragmentación del ADN espermático (135).

La mayoría de las sustancias descritas son causantes directas de una alteración en el equilibrio del sistema regulador de las especies reactivas de oxígeno (ERO), una desregulación a favor de las ERO provocando los daños en el ADN espermático descritos por culpa de un aumento del estrés oxidativo.

7. Estilo de vida:

Se ha evidenciado que un déficit en ciertos nutrientes como el ácido fólico, el cinc y las vitaminas del grupo B, así como un exceso de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, parece que contribuye a desarrollar alteraciones en la fertilidad masculina (136).

Del mismo modo, se ha relacionado la presencia de hábitos de vida no saludables con alteraciones en la fertilidad masculina. Tienen efecto perjudicial sobre la fertilidad masculina:

- ▶ El consumo de alcohol y cafeína (136).
- ▶ El consumo de cannabis y otras drogas (137).
- ▶ El consumo de tabaco es el agente que más ha sido relacionado con la infertilidad. En hombres fumadores, la calidad del semen empeora. De hecho, en aquellos pacientes con varicocele que son fumadores, la oligozoospermia llega a ser 10 veces más frecuente que en los que no fuman (138).

- ▶ Otro agente que ha cobrado importancia, sea como exposición laboral o por ingesta de tabaco es el cadmio. Tóxico para la espermatogénesis y presente en semen de dichos pacientes en doble concentración (139).

También se han relacionado con alteraciones de la fertilidad el estrés psicológico (140), la obesidad y la edad avanzada, con aumentos significativos en la fragmentación de ADN espermático en aquellos varones mayores de 40 años que consultan por infertilidad (141).

8. Quimioterapia y radioterapia:

Diversos tratamientos de quimioterapia y radioterapia con efectos citotóxicos se han relacionado directamente con alteraciones de la fertilidad, sea de manera temporal o permanente, principalmente en forma de azoospermia (141) o de fragmentación del ADN espermático (48).

Estos efectos de la quimio y radioterapia pueden variar dependiendo del tipo de procedimiento, la edad del paciente y la dosis aplicada, llegando a provocar mutaciones en las células germinales que pueden llegar a transmitirse a la descendencia y dar lugar a un aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis (142).

9. Exposición laboral y radiación electromagnética:

La radiación electromagnética de los teléfonos móviles y la exposición al calor se han relacionado con infertilidad masculina como veremos a continuación:

- ▶ Las ondas electromagnéticas producidas por los teléfonos móviles han sido relacionadas con alteraciones en la movilidad, morfología y viabilidad del espermatozoide (143) y dicha alteración se relaciona directamente con la intensidad en la utilización del teléfono móvil, así como la cercanía a la zona testicular, llegando a producir un aumento de la producción de ERO y la consecuente fragmentación aumentada del ADN espermático (144).
- ▶ La exposición a altas temperaturas en el escroto puede dar lugar a alteraciones en la espermatogénesis y favorecer la fragmentación del ADN espermático. Algunos

trabajo, como el personal de oficina con muchas horas en sedestación, conductores de larga distancia, soldadores, trabajadores de la fundición o panaderos (145), o incluso el uso de ordenadores portátiles encima de las piernas (146), pueden dar lugar a hipertermia escrotal, produciendo alteraciones en la espermatogénesis.

1.10.3 Varicocele y fragmentación del ADN espermático

Como se ha ido comentando en este apartado de introducción, existe evidencia de que los varones infértiles presentan unos índices de fragmentación de ADN espermático mayores a los varones fértiles (*Ver Tabla 1.3*). Asimismo, existe relación entre varicocele e infertilidad masculina, que da lugar a un aumento en los valores de fragmentación de ADN, sobre todo en pacientes con varicocele palpable y alteraciones asociadas en el seminograma (147).

En un meta-análisis de 2012, Wang y cols estimaron un aumento cercano al 10% en cuanto a fragmentación de ADN espermático en más de 400 pacientes, comparando pacientes con varicocele respecto a controles sanos (148). De la misma manera, también se ha analizado la alteración del ADN espermático en varones sin alteraciones de la fertilidad (varones con varicocele pero con normozoospermia o adolescentes), objetivándose mayores tasas de alteraciones en la estructura del ADN en pacientes con varicocele respecto a controles sanos, relacionando la presencia de varicocele con un aumento del estrés oxidativo, aportando mayor evidencia a la relación entre varicocele y fragmentación del ADN espermático (147) (*Ver Tabla 1.4*).

A la hora de relacionar el efecto de la varicocelectomía sobre la posible corrección de la fragmentación de ADN espermático, varios estudios objetivan una disminución significativa en las tasas de daño del ADN, por efecto de la misma. En el meta-análisis de Wang y cols se produce un descenso de media del 3,37% en la tasa fragmentación de ADN espermático (148) (*Ver Tabla 1.5*).

Un punto crítico en el estudio de las alteraciones de la fertilidad, el varicocele y su tratamiento corrector, es el hecho de que existe poca evidencia que relacione la mejora en

las tasas de fragmentación de ADN espermático en varones infértiles con varicocele y una mejoría en las tasas de embarazo y reproducción. Esto seguramente se debe a que el proceso de gestación tiene una influencia multifactorial. A favor de la hipótesis de la mejoría de las tasas de embarazo en relación a la mejoría del daño del ADN, Smit y cols publicaron un trabajo sobre 49 pacientes infértiles con oligozoospermia, que tras un seguimiento a dos años, las tasas de fragmentación de ADN espermático eran mayores en los pacientes que no lograron la concepción, sea de manera espontánea o por reproducción asistida (149).

Tabla 1.3: Resumen de resultados de estudios: Fragmentación de ADN espermático por varicocele o por otras causas

Autores	Test	n	Grupos de estudio	Resultados
Estudios que comparan infertilidad por varicocele con infertilidad por otras causas				
Gopalkrishnan y Cols (1999) (150)	NA	40 91 50	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Infertilidad otras causas • Controles sanos 	Daño elevado ADN en infértiles. No diferencias varicocele vs otras causas.
Molina y Cols (2001)(151)	SCSA	18 84 44	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Infertilidad otras causas • Controles sanos 	Daño elevado ADN en infértiles. No diferencias varicocele vs otras causas.
Saleh y Cols (2003)(152)	SCSA	16 15 16	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Infertilidad otras causas • Controles sanos 	Daño elevado ADN en infértiles. No diferencias varicocele vs otras causas.
Enciso y Cols (2003) (153)	SCD	18 103 73	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Infertilidad otras causas • Controles sanos 	Daño elevado ADN en infértiles. No diferencias varicocele vs otras causas.
Salsabili y Cols (2006) (154)	AT	20 28	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Controles sanos 	Sin diferencias en daño ADN en varicocele vs otras causas.
García-Peiró y Cols (2011) (125)	SCD	19 7 6	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidad Varicocele • Infertilidad otras causas • Controles sanos 	Daño elevado ADN en infértiles. No diferencias varicocele vs otras causas.
Estudios que comparan infértiles con varicocele con controles sanos				
Talebi y cols (2008) (155)	SCSA	20 20	<ul style="list-style-type: none"> • Infértiles • Controles sanos 	Daño ADN en varicocele clínico
La Vignera y cols (2012) (156)	TUNEL	30 30	<ul style="list-style-type: none"> • Infértiles • Controles sanos 	Daño ADN en varicocele clínico
Blummer y cols (2012) (157)	COMET	28 31	<ul style="list-style-type: none"> • Infértiles • Controles sanos 	Daño ADN en varicocele clínico

*NA: Naranja de Acridina; SCSA: Estructura de la cromatina; SCD: Dispersión de la cromatina; AT: Azul de Toluidina

Fuente: Elaboración propia a partir de los citados autores

Tabla 1.4: Fragmentación de ADN espermático en varones con varicocele sin infertilidad

Autores	Test	n	Grupos de estudio	Resultados
Estudios en que varicocele produce alteración en ADN				
Chen y cols (2002) (158)	8-OHdG	22 24	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (fértil) • Varicocele subclínico (fértil) 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Chen y cols (2004) (159)	TUNEL	30 15	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (¿fertilidad?) • C o n t r o l e s s a n o s (fértil) 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Bertolla y cols (2006) (160)	COMET	20 20	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (adolescentes) • No varicocele (adolescentes) 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Smith y cols (2006) (161)	SCSA TUNEL	20 20	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (¿fertilidad?) • Donantes de semen 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Blumer y cols (2008) (162)	COMET	30 32	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (¿fertilidad?) • No varicocele 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Wu y cols (2009) (163)	COMET	15 5	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (¿fertilidad?) • C o n t r o l e s s a n o s (fértil) 	Daño elevado ADN varicocele clínico
Estudios en que varicocele no se relaciona con alteración en ADN				
El-Segini y cols (2008) (164)	AT	18 8	<ul style="list-style-type: none"> • Varicocele clínico (fértil) • No varicocele (fértil) 	Daño en ADN similar en los dos grupos

*8-OHdG: 8-hidroxi-deoxi-guanosina; TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labelling; COMET: ensayo del cometa; SCSA: Estructura de la cromatina; AT: Azul de Toluidina

Fuente: Elaboración propia a partir de los citados autores

Tabla 1.5: Efecto de varicocelectomía en DD (cromatina) y ADN

Autores	Test	n	Grupos de estudio	Resultados
Estudios RETROSPECTIVOS				
Zini y cols (2005) (165)	SCSA	37	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Werthman y cols (2003) (166)	SCSA	11	• Tasas elevada DD	Reducción DD tras varicocelectomía
Sakamoto y cols (2008) (167)	TUNEL	11	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Estudios PROSPECTIVOS				
Nasr-Esfahani y cols (2009) (168)	CMA3	162	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Chen y cols (2008) (169)	8-OHdG	30	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Dada y cols (2010) (170)	COMET	11	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Smit y cols (2013) (149)	SCSA	49	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Azadi y cols (2011) (171)	CMA3	52	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Sadek y cols (2011) (172)	AT	72	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía
Lacerda y cols (2011) (173)	COMET	21	• Adolescentes	Reducción DD tras varicocelectomía
Zini y cols (2011) (174)	SCSA	25	• Varones Infértiles	Reducción DD tras varicocelectomía

*CMA3: Cromomicina A-3; SCSA: Estructura de la cromatina; SCD: Dispersión de la cromatina; DD: Cromatina; AT: Azul de Toluidina; 8-OHdG: 8-hidroxi-deoxi-guanosina; TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labelling; COMET: ensayo del cometa

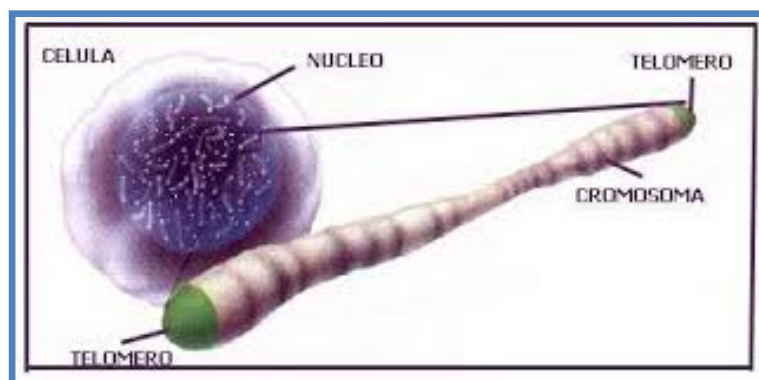
Fuente: Elaboración propia a partir de los citados autores

1.11 Telómeros y longitud telomérica

Los telómeros fueron descubiertos por H.J. Muller y B. McClintock en los años 30 del siglo XX. Desde ese descubrimiento, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los telómeros y las telomerasas gracias los avances tecnológicos de la genética molecular. Blackburn y Szostack en su trabajo de 1984 resumen los principales progresos en el descubrimiento de los telómeros realizados en el siglo XX (175).

Los telómeros son nucleoproteínas especializadas localizadas al final de los cromosomas de las células eucariotas (*Ver Figura 1.30*). Consta de un número variable de secuencias repetitivas de las bases nitrogenadas ricas en Guanina principalmente y que en animales vertebrados son sucesiones de 5'-TTAGGG-3' no codificante (175). La función principal de los telómeros es la de proteger los extremos del cromosoma de su degradación; prevenir que dichos cromosomas sean reconocidos por los sistemas de reparación como si fueran roturas de doble cadena de ADN, así como evitar la fusión de diferentes cromosomas.

Figura 1.30: Esquema de estructura de los telómeros en el cromosoma



Fuente: genome.gov

La longitud telomérica, podría llegar a considerarse como un marcador de edad biológica. Se acepta de manera general que la media de longitud telomérica de las células somáticas humanas es de 15kb (176) (177), y de 10-20kb para las células espermáticas (178). Cada vez que se produce una división celular, se produce un acortamiento de los telómeros de manera natural, y, con el tiempo, los telómeros adquieren una longitud mínima que le indica a la célula que ya no puede dividirse y tiene que entrar en apoptosis (179).

El acortamiento de los telómeros ocurre de manera natural durante el ciclo celular y trae consigo una pérdida de unas 50-200bp de telómeros en cada replicación de ADN (178). De manera añadida, la actividad exonucleasa y las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) producidas por el metabolismo celular, pueden dar lugar también a un acortamiento de los telómeros (180).

Estudios realizados en ratones demostraron que una disminución progresiva de la longitud telomérica daba como resultado una esterilidad y la posibilidad de alteraciones cromosómicas en la descendencia, hecho que se ha relacionado con un aumento de la apoptosis, un secuestro meiótico y errores en la segregación durante la espermatogénesis (181) (180). Posteriormente, en estudios realizados en humanos, se observaron aumentos de las alteraciones cromosómicas cuando los telómeros eran cortos (182), dando lugar a una apoptosis en las células germinales masculinas y a un secuestro de la meiosis en las células germinales femeninas (178).

Estudios en embriones observaron que daños en la longitud telomérica daban lugar a una senescencia celular, con un aumento de la tasa de fallos de implantación y abortos espontáneos del primer trimestre debidos a alteraciones en el desarrollo de los embriones, fragmentaciones citoplasmáticas y apoptosis aumentada (178) (180) (182).

El acortamiento sucesivo de los telómeros en cada división celular se lleva a cabo por la enzima telomerasa. La telomerasa es la encargada de servir al organismo como “*reloj mitótico*”, regulando y midiendo el número de divisiones celulares (183). La longitud crítica telomérica servirá de señal para que la célula entre en senescencia. La actividad de la enzima telomerasa va variando en las diferentes etapas de la vida. Esta actividad de la telomerasa es alta en tejidos con gran proliferación celular (184). Las telomerasas posteriormente se han relacionado se han relacionado con la genética del cáncer y se han demostrado actividad incrementada de la telomerasa en cáncer de mama (185) o de próstata (186).

Así pues, la actividad telomerasa ha cobrado hoy día una importancia crucial en la investigación del cáncer, tanto como posible herramienta para el diagnóstico, como para

definir el pronóstico de las enfermedades, así como para su uso en la búsqueda de terapias anticancerosas (187).

1.12 Antioxidantes

1.12.1 Generalidades

Han sido detectadas numerosas lesiones que pueden originar infertilidad masculina: alteraciones genéticas, infecciosas, hormonales, obstrucciones de la vía seminal, varicocele, alteraciones de la eyaculación, etc. (Como se ha comentado en el apartado de infertilidad) y un considerable número de pacientes en los cuales no podemos definir la etiología precisa de la infertilidad y ante los que carecemos del oportuno diagnóstico y tratamiento. Todos los andrólogos que nos enfrentamos en nuestra práctica diaria al estudio de los pacientes infértiles somos conscientes de la frecuencia con que nos encontramos ante sujetos que no presentan ninguna causa aparente de infertilidad y que suelen aparecer en nuestra consulta con un seminograma que muestra una astenoteratozoospermia más o menos severa o incluso un seminograma normal.

Ante la falta de tratamientos eficaces claramente dirigidos hacia la causa de la infertilidad, los esfuerzos médicos han sido orientados al empleo de las técnicas de reproducción asistida (TRA). El progreso de las técnicas del laboratorio, ha permitido la fecundación de óvulos con un semen de muy mala calidad e incluso con espermatozoides obtenidos directamente del testículo. Las TRA han conseguido embarazos en pacientes con severas alteraciones espermáticas, pero en muchos casos no actúan sobre la causa de la esterilidad. Son técnicas que facilitan la fecundación del óvulo pero hay de tener en cuenta que cuando fecundamos activamente mediante ICSI no somos capaces de asegurar un adecuado legado genético al embrión (Fragmento re-escrito). Diversos autores han demostrado que hay una mayor frecuencia de alteraciones en los hijos que han sido concebidos mediante esta técnica, así Hansen et al encuentran que la incidencia de defectos congénitos es el doble en los concebidos mediante FIV/ICSI que en los concebidos de manera natural (188), se ha apreciado un aumento de las alteraciones de la impronta genética (189), malformaciones congénitas (190) y una frecuencia de testículos no descendidos ocho veces superior en

niños concebidos por ICSI (191) De todas formas, por lo general, estas técnicas presentan buenos resultados y no hay evidencia alguna de que puedan calificarse como no seguras.

En los tratados clásicos de andrología se citaba la existencia de una serie de factores tóxicos que podrían afectar a la espermatogénesis, sin conocer el mecanismo por el cual se producía el daño espermático pero se relacionaban con una mala calidad seminal, entre otros eran citados el calor, la exposición a metales pesados, pesticidas, radiaciones ionizantes, alcohol, tabaco, obesidad (192)... Solo los avances en el estudio de la biología del espermatozoide nos han permitido relacionar estos casos de infertilidad de causa no justificada con la presencia de fragmentación del ADN espermático. La fragmentación del ADN espermático está hoy día considerada un importante factor en la etiología de la infertilidad en el varón (193).

La fragmentación del ADN espermático puede producirse por distintos motivos, pero la causa más frecuente que la origina es la producción de radicales libres. Estas sustancias son fundamentalmente el anión superóxido y el radical hidroxilo, que se caracterizan por ser especies muy reactivas ya que poseen uno o más electrones desapareados en su última capa (106).

Ya en 1943 MacLeod observó que el espermatozoide humano es capaz de producir Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (194). Posteriormente se ha demostrado que el estrés oxidativo es la principal causa de daño en el ADN espermático tanto a nivel mitocondrial como nuclear (195), y que este daño se manifiesta fundamentalmente por su fragmentación. El espermatozoide es una célula muy sensible al estrés oxidativo, tiene escaso citoplasma y pocas posibilidades de combatir los radicales libres por falta de protección intrínseca antioxidativa, los denominados “*ROS scavengers*”, de esta forma cuando los radicales libres aumentan se producen lesiones que afectan fundamentalmente a la membrana espermática y a la fragmentación de su ADN (196), tanto el mitocondrial como el nuclear, en el primero de los casos afectará a la cadena respiratoria y al metabolismo celular, y en el segundo podrá originar defectos en su estructura que podrían ser responsables de fallos de fecundación, abortos o diversas alteraciones en la descendencia.

Diversos autores han evidenciado un aumento de ERO en el semen de pacientes infértiles en relación al de hombres fértiles, incluso se ha sugerido que es un factor contribuyente de manera significativa del 30-80% de todos los casos de infertilidad masculina (197) (198) (199). Tanto el tabaco como la edad aumentan los niveles de daño del ADN espermático (106). Además de las causas genéticas, un aumento del estrés oxidativo se ha considerado un importante factor contribuyente a la infertilidad masculina (200).

Pero no todo es negativo en relación a los radicales libres. Ciertos niveles de ERO son necesarios para conseguir la capacitación espermática, la hiperactivación, reacción acrosómica, la fijación del esperma y la fusión con el ovocito (201). Existe pues una relación entre la formación y destrucción de las ERO de manera que una mayor producción de ERO o una menor eficacia de los antioxidantes naturales puede provocar una afectación celular por estos radicales, pero a su vez un exceso en la acción antioxidante podría inhibir la necesaria acción de las ERO en la maduración espermática y la reacción acrosómica (201). Esta situación dificultaría también la fecundación, y es lo que se denomina comúnmente "*antiox paradox*" (202), y debe ser tomada en cuenta a la hora de aplicar un tratamiento antioxidante de forma incontrolada, a dosis elevadas o bien someter a los espermatozoides a una alta concentración de antioxidantes antes de la utilización de las técnicas de reproducción asistida.

La protección espermática ante los ERO durante la espermatogénesis depende fundamentalmente de la acción del sistema glutatión que proviene de las células de Sertoli, y en el epidídimo son los sistemas enzimáticos como el glutatión peroxidasa, catalasas, dioxigenasa de indolamina y superóxido dismutasa los que se encargan de eliminar el exceso de radicales libres (202). Otras sustancias responsables de la protección del espermatozoide contra los ERO se encuentran en el plasma seminal y son fundamentalmente las vitaminas C y E, el ácido úrico y el glutatión (203).

Así pues, podemos resumir que parece demostrado que los radicales libres producidos por el metabolismo celular espermático y por la mayor o menor presencia de leucocitos en semen van a afectar al espermatozoide de dos maneras, una positiva cuando sus niveles no son muy elevados y otra negativa cuando la actividad de los antioxidantes naturales se vea

sobrepasada por factores que favorezcan la proliferación de las ERO como son la infección, los tóxicos medioambientales o el varicocele. Cuando esto suceda los radicales libres pueden afectar tanto a la membrana espermática como a la propia célula provocando un descenso de la motilidad del espermatozoide y un aumento de la fragmentación de su ADN, ambas situaciones relacionadas con la infertilidad.

Parece pues evidente que, en una situación ideal, para plantear un tratamiento correcto ante una pareja infértil, debería realizarse un estudio de la fragmentación del ADN espermático y, consecuentemente una medición de los niveles de radicales libres y de actividad antioxidante total (TAA) en semen. Autores como Omran (204) relacionan el descenso de la TAA con un aumento de la fragmentación del ADN y con seminogramas anormales en hombres infértiles y como ya hemos citado, la fragmentación de ADN no se utiliza como rutina en los análisis de semen como estudio rutinario, y sigue debatiéndose en las sociedades científicas si este examen debería incluirse (203). En nuestro grupo pensamos que dada la alta incidencia del ADN fragmentado en varones infértiles, su valoración debería ser un parámetro habitual, junto con el estudio seminal.

1.12.2 Antioxidantes y salud general

Se ha sugerido que el stress oxidativo produce, al interaccionar con las proteínas celulares, daños estructurales que pueden ser el origen de enfermedades crónicas entre ellas la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Hasta tal punto se ha divulgado esta idea que los complejos multivitamínicos son actualmente el suplemento alimentario más común, que toma con regularidad por lo menos un tercio de la población adulta de Estados Unidos (205).

En la diabetes ha sido observada una peroxidación lipídica aumentada, debida a los radicales libres y un descenso en los niveles de antioxidantes. Cuerda y cols publicaron un interesante meta-análisis de los trabajos realizados tras el tratamiento suplementario con antioxidantes (fundamentalmente vitaminas E y C) en pacientes diabéticos o con alteraciones cardiovasculares (206). Ellos concluyen que los estudios en los que se aplica el tratamiento incluyendo diferentes antioxidantes no han demostrado ningún efecto beneficioso en la mortalidad global o cardiovascular en diferentes grupos de pacientes,

incluyendo pacientes diabéticos. Ninguno de los estudios ha demostrado un efecto beneficioso de los suplementos antioxidantes en la prevención de la diabetes. De acuerdo con los estudios del meta-análisis, dichos suplementos pueden disminuir la peroxidación de los lípidos, disminuir la oxidación de las partículas de colesterol *Low Density Lipids* (LDL) y mejorar la función endotelial y la vasodilatación secundaria del endotelio, sin un aumento significativo del control metabólico de dichos pacientes (206).

Entre los estudios más importantes realizados para observar el papel del tratamiento antioxidante sobre la salud en general y la prevención de enfermedades se encuentra el estudio SUVIMAX (207), donde se evaluó el efecto de una combinación diaria de 6mg de β -caroteno, 120 mg de vitamina C, 30 mg de vitamina E, 100 microg de selenio y 25 mg de Zn, en una población de 13.017 adultos franceses de 35 a 60 años de forma aleatoria, doble ciego y placebo control durante un promedio de 7,5 años. No se detectaron diferencias importantes entre los grupos en la incidencia total de cáncer, incidencia de enfermedad cardiovascular o mortalidad por cualquier causa. Sin embargo se apreció un efecto protector de los antioxidantes ante el cáncer y la mortalidad por cualquier causa en los hombres pero no en las mujeres, esto se atribuyó a los menores niveles basales de β -caroteno en los varones (207).

Estos y otros estudios ponen de manifiesto la preocupación existente en la relación del estrés oxidativo y la enfermedad, sin embargo no se han llegado todavía a conclusiones definitivas, se ha criticado en ocasiones la metodología, dosis o conclusiones de dichos trabajos. En concreto la *The U.S. Preventive Services Task Force* concluye que la evidencia actual es insuficiente para determinar el balance de riesgos y beneficios de los complejos multivitamínicos para la prevención de las enfermedades cardiovasculares o el cáncer, posicionándose en contra de los suplementos de β -carotenos i vitamina E para la prevención de enfermedades cardiovasculares o el cáncer con un grado de recomendación D (208).

1.12.3 Prevención del estrés oxidativo y fragmentación de ADN espermático en el hombre infértil

La primera medida para evitar la fragmentación del ADN espermático sería conocer cuáles son los factores que pueden lesionarlo y evitarlas en la mayor medida posible. Como se ha comentado en el apartado de etiología de la fragmentación de ADN espermático, existen varios factores modificables que pueden suponer una fuente alternativa de radicales libres, como son la leucocitospermia, el varicocele, tabaco, pesticidas y xenobióticos, presencia de fuentes de calor, radiación electromagnética (por el uso del teléfono móvil o radiaciones ionizantes) e incluso la obesidad o el consumo de alcohol, cannabis, radioterapia, quimioterapia, etc.

Todos los factores anteriormente citados representan causas posibles de infertilidad masculina, son modificables mediante cambios en los estilos de vida sin riesgo alguno, se deberían investigar y recomendar su corrección, sobre todo en aquellos casos de infertilidad masculina idiopática.

Se ha relacionado en la literatura científica un bajo nivel de antioxidantes de la dieta con la mala calidad seminal (209). Otros estudios han encontrado una menor frecuencia de aneuploidias en el semen en aquellos varones con una ingesta alta en la dieta de antioxidantes respecto a aquellos con una ingesta baja de antioxidantes (210). Como dice la sabiduría popular "somos lo que comemos" y en este punto deberíamos hacer alguna reflexión.

Una dieta equilibrada, rica en fruta y vegetales nos debe proporcionar una suficiente fuente de antioxidantes y debería no hacer necesario ningún tratamiento suplementario. Un ejemplo claro de dieta saludable ha sido considerado desde hace años la "*dieta mediterránea*", donde las legumbres, cereales, frutas, verduras y aceites vegetales tienen un papel predominante. Sin embargo en los países occidentales y con las nuevas costumbres alimenticias de comida rápida se está perdiendo el hábito de la comida variada, se abusa de las grasas animales y de la comida preparada a la que además se le suelen añadir conservantes y otras sustancias químicas para mejorar el sabor y su aspecto visual y así estimular su consumo.

La preocupación que algunos individuos tienen por este tipo de dieta les lleva, no a modificarla, sino a completar sus posibles deficiencias con suplementos minerales y vitamínicos. Estas sustancias suelen autoadministrarse de forma más o menos empírica según las publicaciones divulgativas que hayan caído en sus manos, muchas veces sin control y sin tener en cuenta ni las necesidades reales ni los posibles efectos secundarios que puede tener su ingesta excesiva.

Los denominados nutracéuticos, son alimentos o ingredientes de los alimentos que proporcionan beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de enfermedades (211). En relación a su acción antioxidante, estas sustancias son fundamentalmente: Vitaminas A, C y E, ácido fólico, selenio, zinc, carnitina, arginina, coenzima Q10, glutatión, licopenos y ácidos grasos omega 3. Estos antioxidantes serán comentados paso a paso en el siguiente apartado. Una ingesta suficiente y periódica de los alimentos que los contienen es la manera más natural de mantener el nivel adecuado de antioxidantes para que puedan realizarse de una manera fisiológica todas sus funciones.

1.12.4 Tratamientos antioxidantes

Basándonos en los conocimientos actuales sobre la acción de los radicales libres en la fragmentación del ADN y de la nociva acción de ésta sobre la fertilidad, parece evidente que un tratamiento que provoque un efecto antioxidante debería ser contemplado como una importante opción en sujetos con alto porcentaje de fragmentación de su ADN espermático. Diversos artículos, como la revisión de Tremellen apoyan esta teoría, en la que el semen de varones fértiles tiene una capacidad antioxidante más efectiva que el semen de los hombres infértiles (212). Hay múltiples publicaciones que avalan el papel positivo del tratamiento con antioxidantes en pacientes infértiles en relación tanto a los parámetros seminales como en las tasas de embarazo después de las terapias de reproducción asistida (213) (214) (215).

Las principales sustancias antioxidantes estudiadas han sido:

▶ Carnitina:

La carnitina se sintetiza a partir de los aminoácidos lisina y metionina. Sus formas más importantes son L-carnitina y L-acetilcarnitina. La carnitina juega un importante papel en el metabolismo energético del espermatozoide, se acumula en el epidídimo y protege al ADN espermático y las membranas celulares del daño producido por los radicales libres y la apoptosis que dicho daño produciría. Protege contra la peroxidación lipídica de los lípidos de membrana (216). La carnitina se ha utilizado a dosis de 3 grs/día durante 4 meses, 4grs/día de carnitina durante 2 meses y 2 grs de carnitina/día apreciando un aumento de la motilidad, concentración y mejorías en la morfología de los espermatozoides (217) (218) (219). Sin embargo, Sigman y cols no encontraron mejoría de la astenospermia tras 6 meses de tratamiento con 2 y 1 gr de L-carnitina and L-acetilcarnitina (220).

Las fuentes de carnitina en la dieta son principalmente carnes rojas, carnes de ave y pescado. La dosis recomendada tolerada de carnitina no está bien establecida. La ingesta en exceso de más de 4grs/día puede dar lugar a náuseas, convulsiones y a secreciones malolientes (211).

▶ Vitamina C:

La vitamina C o ácido ascórbico es un cofactor para las reacciones de hidroxilación y amidación. Es una potente “ROS scavenger”, comportándose como un importante antioxidante. Sus niveles en plasma seminal han sido relacionados con el porcentaje de espermatozoides normales (221). En grandes fumadores, la ingesta de al menos 200 mg diarios de vitamina C mejoró el recuento, la motilidad y la vitalidad espermática. Los mejores resultados se obtuvieron con una dosis de 1000 mg/día (222).

Por otra parte Abel y cols (223) y Hargreave y cols (224) no encontraron mejoría con dosis de 200 mg/día durante 6 meses, en la tasa de embarazos en relación con otros tratamientos como citrato de clomifeno y mesterolona.

La vitamina C es abundante en las frutas y vegetales: cítricos, kiwi, papaya, fresas, brócoli, pimiento, col rizada... la dosis mínima diaria para llenar los depósitos es de 90 mg.

La ingesta de más de 2000 mg/día puede provocar dispepsia, cefalea y un riesgo aumentado de nefrolitiasis (225).

▶ Vitamina E:

Es uno de los antioxidantes liposolubles más importantes, inhibe el daño de los radicales libres a nivel de la membrana celular, previene la peroxidación lipídica y mejora la actividad de otros antioxidantes. La terapia de combinación con vitamina C ha mostrado una significativa mejora de la fragmentación del ADN (226). Comhaire y cols observaron la reducción de ERO en un grupo de 27 pacientes infértiles utilizando un tratamiento de 180 mg/día de vitamina E y 30 mg/día de β -caroteno, aunque no se apreció mejoría de los parámetros seminales (227). Suleiman y cols administrando 300 mg de vitamina E/día durante 6 meses observaron una reducción de la peroxidación lipídica y un aumento en motilidad y la tasa de embarazos respecto al grupo control (228).

La vitamina E se encuentra en vegetales, cereales, aceites vegetales, germen de trigo, huevos, carne roja y carne de aves. La dosis diaria tolerable recomendada es de 15 mg. Dosis superiores a los 400 mg/día se han relacionado con un aumento del riesgo cardiovascular, en especial infartos de miocardio. Dosis superiores a los 800 mg/día pueden incrementar el riesgo de hemorragia por un efecto antiplaquetario (229). Los pacientes afectos de patologías hematológicas deberían ser informados de sus posibles complicaciones con la ingesta de esta vitamina.

▶ Zinc:

El zinc es un cofactor de muchas enzimas utilizadas en la transcripción del ADN y la síntesis de proteínas. Tiene propiedades antioxidantes por acción sobre la superóxido dismutasa, antiapoptóticas, inmunológicas e interviene en el desarrollo testicular y la esteroidogénesis. La deficiencia de zinc se ha asociado a anomalías flagelares y de la pieza intermedia (230). Se encuentra en altas concentraciones a nivel prostático y su deficiencia se ha relacionado con oligospermia y descenso de testosterona (211) (231). Asociado a Vitaminas C y E ha mostrado una disminución de ERO, apoptosis y de la fragmentación de ADN espermático, así como un aumento de la motilidad espermática (232). Wong y cols

observaron mejoría de la concentración espermática en un estudio con 103 varones infértiles tratados con 5 mg de ácido fólico y 66 mg de sulfato de zinc al día (233). Young y cols con una combinación de las mismas sustancias y antioxidantes apreció un descenso de disomía X significativo en 89 hombres sanos con aneuploidia espermática (234).

Podemos encontrar el zinc en las verduras, el trigo, semillas y carne de vacuno. Su deficiencia en países industrializados es rara porque suele ser un aditivo de muchas comidas preparadas. La dosis diaria tolerable recomendada es de 11mg y una ingesta superior a 200 mg puede provocar úlcera gástrica, pérdida de apetito, cefaleas, rash cutáneo y deshidratación. Un aporte mayor de 450 mg/día puede alterar la función del hierro, disminuye los niveles de cobre, reduce la función inmune y ocasiona anemia sideroblástica (211).

▶ Selenio:

El selenio es un elemento importante en el desarrollo testicular, espermatogénesis, capacitación y motilidad espermática. Tiene un importante papel antioxidante y es un componente de la glutatión peroxidasa. También interviene en la reducción de enzimas antioxidantes (211).

La deficiencia de selenio provoca descenso de la motilidad espermática, roturas a nivel de la pieza intermedia y aumento de la teratozoospermia. Algunos estudios han mostrado relación entre la concentración espermática y los niveles de selenio en plasma seminal (235), así como aumento de la motilidad tras la administración de selenio sólo o en combinación con otros antioxidantes (236). Moslemi encontró un aumento de la tasa de embarazos en 690 infértiles tratados aunque su estudio no es randomizado controlado con placebo (237). En unión con la vitamina E tiene un efecto antiperoxidante (238). Por otra parte otros autores no han encontrado mejoría seminal tras la suplementación con selenio (239) (240).

Alimentos de origen vegetal son las principales fuentes de selenio en la dieta: nueces, nueces de Brasil, cereales, huevos, carnes y mariscos. La dosis diaria tolerable recomendada es de 55 microgrs y su límite de tolerancia es 400 microgrs/día para el

Intitute of Medicine (United states) o 300 microgrs/día para la *European Commission and the World Health Organization* (241). El contenido de selenio en las comidas depende del suelo en el que las plantas hayan crecido. La deficiencia de selenio puede aparecer en regiones volcánicas y es endémica de ciertas áreas rurales de China provocando la enfermedad de Keshan (cardiomiopatía reversible con suplementos de selenio) (242). Por otra parte la toxicidad por selenio o selenosis provoca fragilidad o pérdida del pelo y las uñas, problemas gastrointestinales, rash cutáneo, aliento a pan de ajo, sensibilidad muscular, temblores, gusto metálico e insuficiencia hepática y renal.

► Carotenoides y Vitamina A:

Existen una serie de compuestos relacionados con la vitamina A que muestran una acción protectora de los epitelios y acción antioxidante (215). Los carotenoides de las frutas y verduras de la dieta son la principal fuente de vitamina A. La molécula de β -caroteno se parte en dos moléculas de vitamina A (retinol), en un proceso que ocurre en el intestino. El déficit de vitamina A ha mostrado experimentalmente un efecto dañino sobre la espermatogénesis, el funcionamiento de las células de Sertoli y la barrera sanguínea testicular (243). Por otra parte se han visto efectos positivos del tratamiento combinado de vitamina A y otras sustancias antioxidantes en relación con la motilidad y concentración espermática (214).

La vitamina A se encuentra en zanahorias, calabaza, huevos, aceite de pescado y productos cárnicos. La dosis diaria tolerable recomendada es de 900 microg, sin pasar los 3000 microg. Al ser una vitamina liposoluble puede acumularse y manifestar síntomas de toxicidad como fatiga, papiledema, vértigo, anorexia, fiebre, descamación, toxicidad hepática, anemia hipoplasica, dolores articulares y cambios visuales o del estado mental (211).

El Licopeno es un carotenoide que interviene en la regulación del crecimiento celular, modulación de la expresión genética, respuesta inmune y protección de la peroxidación lipídica. Es abundante en las glándulas adrenales, hígado, próstata y testículos. Administrado a dosis de 200 mg dos veces al día durante 3 meses ha mostrado mejorar la concentración espermática en el 66% de los pacientes, motilidad en 53% y morfología

espermática (244). El licopeno es muy abundante en el tomate y sus productos cocinados por lo que no suele ser necesario un tratamiento suplementario.

Dentro de este grupo de sustancias, Comhaire ha publicado un estudio randomizado doble ciego sobre el uso de astaxantina 16 mg al día durante 3 meses, en el que obtiene un aumento significativo de las tasas de embarazo comparado con placebo (245).

▶ Arginina:

La arginina es un precursor del óxido nítrico relacionado con la respuesta inflamatoria celular que actúa favoreciendo la protección contra el daño oxidativo (246). Es esencial para la motilidad espermática, capacitación, metabolismo y reacción acrosómica. Existen resultados controvertidos en cuanto al uso de la arginina. Mientras algún estudio ha mostrado mejoría de la motilidad y concentración espermática (247), otros no la encuentran o incluso, como publicaron Srivastava y cols, que observaron que una excesiva concentración de arginina puede empeorar la función espermática (248).

La dosis diaria tolerable recomendada es de 20 gr sin sobrepasar los 30 gr. Puede obtenerse del arroz integral, la cebada, nueces, cereales, chocolate, coco, semillas y varios derivados de la carne. Los efectos secundarios por exceso de consumo pueden ser: anomalías electrolíticas, riesgo aumentado de sangrado, aumento de los niveles de glucosa, insuficiencia renal, alteraciones gastrointestinales y asma (211).

▶ Pentoxifilina:

La pentoxifilina es un inhibidor competitivo no selectivo de la fosfodiesterasa que aumenta la adenosina cíclica monofosfato intracelular y reduce los radicales libres (249), preserva la movilidad espermática *In vitro* (250) y ha sido utilizado oralmente con el fin de mejorar los parámetros seminales en especial la movilidad. Algunos autores como Okada sólo han encontrado mejoría con dosis altas como 1200 mg/día (251).

▶ Glutati6n y N-acetilcisteina:

El glutati6n es uno de los antioxidantes end6genos m6s abundantes, protege a los l6pidos, prote6nas y 6cidos nucleicos. Se combina con la vitamina E y selenio para formar la

glutación peroxidasa. El glutación es sintetizado en el hígado a partir de cisteína, ácido glutámico y glicina. Entre sus propiedades se encuentra su acción de desintoxicación de sustancias carcinogénicas y agentes nocivos externos (252). La deficiencia de glutación puede hacer que la pieza intermedia del espermatozoide sea inestable originando alteraciones de motilidad y morfología (253).

Los suplementos orales con glutación han logrado mejorar la movilidad espermática en pacientes con varicocele (254) y también cuando se administra combinado con vitaminas C y E (255). En estudios *in vitro* se ha descrito un efecto protector del glutación contra el daño al ADN provocado por radicales libres (227), incluso contra el producido por acción de los leucocitos (256).

Por ser un producto de síntesis endógena, el glutación no tiene establecida una dosis diaria recomendada, si bien suplementos de hasta 3 grs al día han demostrado ser seguros, estos deben administrarse por vía intramuscular dada su mala absorción intestinal (254).

La N-acetilcisteína (derivada del aminoácido L-cisteína), como precursora del glutación se encarga de aumentar los niveles de antioxidantes endógenos. Para Comhaire y cols su ingesta no mejora los parámetros seminales (245), mientras que para Ciftci y cols mejora la motilidad, viscosidad y el estado oxidativo seminal (257). Parece que los resultados pueden ser mejores si se administra conjuntamente con selenio (258).

▶ Superoxido dismutasa:

Algunos estudios han publicado efectos beneficiosos de la superoxido dismutasa contra la peroxidación lipídica *in vitro* (259) (260), apreciándose una mejoría de la motilidad espermática. Sin embargo, Twigg y cols no encontraron el mismo beneficio (261).

▶ Coenzima Q10:

Es un transportador de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial y se utiliza para producir energía en la pieza intermedia del espermatozoide (262). La membrana espermática contiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Por ser un antioxidante liposoluble, la coenzima Q10 es capaz de protegerla del estrés oxidativo. La coenzima Q10 se puede encontrar tanto dentro del espermatozoide como en el plasma

seminal donde pasa por un proceso activo que puede estar alterado en enfermedades como el varicocele. Se postula que el aumento de radicales libres en la célula puede provocar el aumento del consumo de coenzima Q10 que induce una disminución de su papel energético (262).

Varios estudios han mostrado que los niveles de coenzima Q10 en plasma seminal se correlacionan con el recuento espermático y la movilidad. Algunos autores han publicado un aumento de la movilidad entre el 4.5 - 6%. (262) (263) (264). En un meta-análisis de 2013, Lafuente y cols concluyen que: no hay evidencia de que la coenzima Q10 produzca aumentos en la tasa de embarazos, pero sí que se observa una mejoría en los parámetros del seminograma (265).

Coenzima Q10 puede obtenerse en granos enteros, salvado de arroz, bayas de soja, nueces, zanahoria, cebolla, patata, espinacas, aceite de pescado y el repollo. Puede ser sintetizado en el organismo por lo que su dosis diaria recomendada no ha sido establecida. Basándose en estudios previos se estima que la ingesta óptima es de 200-300 mg/día. Las necesidades diarias están sobre 12 mg/kg/día. Con una dieta adecuada no es necesario tomar suplementos. La excesiva ingesta de coenzima Q10 puede provocar cefalea, pérdida de apetito, rash cutáneo y alteraciones gastrointestinales (211).

▶ Ácidos grasos omega 3:

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, de sus siglas en inglés) son principalmente omega-3 (ácido α -linolénico (ALA), ácido decosahexanoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA)) y omega-6 (ácido araquidónico, ácido linoleico y ácido γ -linolénico). Los PUFAs son esenciales porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano. Constituyen, como ya se ha comentado, un constituyente estructural de la membrana celular y protegen al espermatozoide de los radicales libres. La fertilización exitosa del espermatozoide depende de los lípidos de membrana (266).

Han sido descritas concentraciones menores de DHA en esperma de pacientes con astenozoospermia y oligozoospermia (267). Safarinejad y cols encontraron correlación entre la concentración en plasma sanguíneo de ácidos grasos omega 3 y su concentración

en esperma, así como relación entre en omega 3 sanguíneo y la concentración, movilidad y morfología espermática, concluyendo que los varones fértiles tienen una mayor concentración de omega 3 y una menor de omega 6 (268).

Otros estudios han mostrado mejoría de la morfología y del recuento espermático total tras el tratamiento con omega-3 (269) (270).

Las fuentes principales de omega 3 son los aceites derivados del pescado, principalmente del pescado azul, las nueces y los vegetales. DHA y EPA se encuentran en pescados de aguas frías (anchoas, salmón, atún, arenques, sardinas y caballa) y suplementos de aceites de pescado. ALA se encuentra en semillas de lino, bayas de soja, semillas de calabaza, verdolaga, nueces y sus respectivos aceites (269).

Se considera aceptable una ingesta diaria de 1,6 gr/día de omega 3, aunque no hay dosis diarias recomendadas. Los ácidos grasos omega 3 se utilizan para enriquecer diversas comidas procesadas (bollería, huevos, margarinas, carnes, leche, aceites, pasta...) Esto hace que su deficiencia sea improbable en los países industrializados. El exceso de ingesta puede dar lugar a un aumento del riesgo hemorrágico, hecho a tener en cuenta en pacientes en tratamiento anticoagulante o antiplaquetario (271).

▶ Ácido fólico:

El ácido fólico juega un papel importante en la síntesis del ADN, es un potente agente eliminador de radicales libres. Es una vitamina hidrosoluble (vitamina B9). Su ingesta adecuada se ha relacionado con una menor frecuencia de anomalías en el ADN espermático (234). En el estudio de Wong y cols se encontró un aumento del recuento espermático del 74% al administrar ácido fólico y zinc (233).

La dosis diaria tolerable recomendada de ácido fólico es de 400 microg. Una excesiva ingesta puede dar lugar a: problemas del sueño, irritabilidad, confusión y alteraciones gastrointestinales. En algunos casos de pacientes con historia de cardiopatía, se ha relacionado con infartos de miocardio (272). El ácido fólico se encuentra principalmente en el aguacate, las judías, los cereales, los cítricos, huevos, vegetales de hoja verde oscuro, y productos de la carne (273).

▶ Fitoestrógenos:

Son sustancias no esteroideas derivadas de plantas, de estructura similar al estradiol y que pueden unirse o activar los receptores estrogénicos. Un grupo de estos fitoestrógenos son las isoflavonas, sustancias que se encuentran fundamentalmente en los productos de soja y cuyos metabolitos tienen propiedades antioxidantes (274).

Song y cols publicaron mejoría del recuento espermático y la movilidad con suplementos de soja (275), aunque Chavarro y cols en un estudio con 99 hombres encontraron que la ingesta de alimentos de soja e isoflavonas estaba inversamente relacionada con la concentración de esperma (276).

A pesar de que en un reciente meta-análisis demuestra que la ingesta de isoflavonas no altera los niveles de testosterona (277), la falta de estudios randomizados controlados con placebo desaconseja su uso habitual en hombres infértiles, dado el efecto estrogénico de estas sustancias.

1.12.5 Conclusiones sobre los antioxidantes

El descubrimiento de los radicales libres tanto en el espermatozoide como en el líquido seminal, la relación del estrés oxidativo con la fragmentación del ADN espermático y la comprobación de que el semen presenta sustancias antioxidantes que pueden disminuir la agresión ocasionada por estos agentes, ha abierto una nueva puerta para el estudio del hombre infértil.

Si no tenemos en cuenta las técnicas de reproducción asistida, hay que reconocer que hasta la fecha son pocos los tratamientos que han demostrado su eficacia en el manejo de la infertilidad masculina. Es por esto que cualquier posibilidad de mejorar la fertilidad de nuestros pacientes dentro del campo de la andrología es recibida con entusiasmo, más si, como en el caso de los antioxidantes, sus efectos secundarios no suelen presentar gravedad.

Así pues, múltiples autores se han lanzado al tratamiento con antioxidantes del hombre infértil y se han publicado múltiples trabajos, algunos de los cuales han sido recogidos en este apartado de antioxidantes. Muchas de estas publicaciones muestran un efecto positivo

de este tratamiento y seguramente así debe ser en muchos casos. Se han demostrado en estudios como el de Abad y cols los efectos beneficiosos de un tratamiento combinado de antioxidantes en pacientes con astenoteratozoospermia, apreciando una mejoría no solo de los parámetros seminales, sino también una disminución de los niveles de fragmentación del ADN espermático (120). De la misma manera, se ha demostrado que el tratamiento con una combinación de antioxidantes mejora la calidad espermática en pacientes con varicocele grado I, observándose un aumento del recuento espermático y una reducción media significativa de la fragmentación del ADN espermático del 22,1%, y del 31,3% en las células espermáticas con gran fragmentación previa (278).

Pero de acuerdo con las exhaustivas revisiones realizadas por Lombardo y cols (216), Ko y cols (211), y Mora-Esteves (230), la opinión científica de los expertos es que faltan más estudios randomizados, doble ciego, controlados con placebo, y con suficiente número de pacientes para poder llegar a resultados más concluyentes.

En la práctica podemos resumir que el tratamiento antioxidante parece eficaz tanto *in vivo* como *in vitro* (Greco y cols, nivel de evidencia B (279)). La combinación de antioxidantes se ha realizado de forma empírica y no parece aumentar los efectos secundarios del tratamiento. La duración de los tratamientos publicados oscila entre 2 y 6 meses (el ciclo espermático está alrededor de 64 días) (280). En cualquier caso y ante la falta de estudios más concluyentes cada médico deberá utilizar estos tratamientos ajustándose lo mejor posible a las dosis recomendadas hasta ahora en la literatura y a la combinación que le parezca más adecuada durante un tiempo suficiente para cubrir sobradamente todo el ciclo espermático. Hay que tener cuidado con los efectos secundarios sobre todo de las sustancias que tienen tendencia a acumularse en el organismo (vitaminas liposolubles, selenio, etc.).

Distintas consideraciones dificultan una correcta valoración de los resultados de este tratamiento, en primer lugar no se han llegado a consensuar unas dosis terapéuticas para cada antioxidante de manera que sean suficiente fuertes para eliminar el efecto negativo de los radicales libres pero no tanto como para suprimir su acción positiva en la capacitación espermática y el proceso de fecundación. Tampoco tenemos datos objetivos para

discriminar qué pacientes se van a beneficiar del tratamiento antioxidante, utilizamos muchas veces el porcentaje de ADN fragmentado pero además deberíamos cuantificar el poder oxidante del semen o la actividad antioxidante total del mismo, autores como Ménézco recomiendan un estudio del núcleo espermático (fragmentación de ADN o pérdida de condensación nuclear) antes de comenzar el tratamiento (281).

Por último, la variabilidad intrapersonal del seminograma, la capacidad del ovocito para reparar el daño en el ADN espermático y la presencia de un posible factor femenino desconocido o infravalorado son otras dificultades añadidas a la hora de evaluar el éxito del tratamiento y las tasas de embarazo conseguido en las parejas infértiles por factor masculino.

En el año 2011 la biblioteca *Cochrane* (199) realizó una revisión de los tratamientos antioxidantes utilizados en la infertilidad masculina, planteándose si los suplementos de antioxidantes orales mejoraban los resultados de las técnicas de reproducción asistida en parejas con alteraciones del factor masculino o infertilidad inexplicada, y si estos diferentes antioxidantes ofrecían diferentes resultados al utilizar dichas técnicas.

Se revisaron 34 estudios randomizados y controlados que implicaban a 2.876 parejas. El objetivo primario fue el aumento de la tasa de nacimientos vivos por pareja. Los objetivos secundarios incluían: las tasas de embarazo, tasas de aborto espontáneo, tasa de muerte fetal, nivel de daño en el ADN espermático y efectos secundarios del tratamiento.

Los resultados obtenidos mostraron que hay un incremento significativo en la tasa de nacimientos en comparación con placebo. Los autores concluyeron que los suplementos con antioxidantes pueden mejorar los nacimientos vivos, las tasas de embarazo en parejas con subfertilidad en reproducción asistida. Ninguno de los estudios evidenció efectos secundarios perjudiciales del tratamiento antioxidante utilizado. Posteriores estudios cohortes, para un “cara a cara” de los diferentes antioxidantes serían necesarios para identificar la superioridad de un antioxidante frente a otro (199).

Todas estas consideraciones nos indican lo difícil que va a ser el camino hasta que podamos llegar a unas conclusiones definitivas, pero hoy por hoy, debemos reconocer que

cuanto menos, el tratamiento antioxidante es un reto prometedor en el todavía decepcionante tratamiento del hombre infértil.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Hipótesis primera

- ▶ El varicocele clínico o palpable puede tener un efecto perjudicial en la maduración espermática, reduciendo la longitud telomérica, hecho que podría ocasionar alteraciones en la fertilidad.

Hipótesis segunda

- ▶ En pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable, la microvaricocelectomía puede tener un efecto positivo en la recuperación de la longitud telomérica, así como un descenso en la fragmentación de ADN espermático.

Hipótesis tercera

- ▶ El tratamiento con antioxidantes orales puede mejorar la integridad del ADN espermático y los valores del seminograma en pacientes con varicocele subclínico o no palpable.

2.2 Objetivos

Objetivo primero

Determinar el efecto del varicocele sobre la longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable.

Objetivo segundo

Determinar el efecto de la microcirugía del varicocele sobre la fragmentación y longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable.

Objetivo tercero

Determinar el efecto del tratamiento antioxidante oral sobre la fragmentación de ADN espermático y valores del seminograma convencional en pacientes infértiles con varicocele subclínico o no palpable.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes

3.1.1 Procedencia

Para la consecución de los objetivos establecidos, se han precisado de muestras de semen humano de 40 pacientes en estudio de infertilidad y diagnosticados de varicocele.

Para este trabajo, se ha establecido una colaboración entre el servicio de Urología del Hospital Universitario Parc Taulí de Sabadell, el laboratorio de inmunología del centro de diagnóstico UDIAT (en el Parc Taulí de Sadadell) y la empresa CIMAB (*Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona*), una “spin-off” de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

El diagnóstico de varicocele clínico o subclínico se ha realizado por los protocolos del servicio de Urología. En la consulta de Andrología se ha realizado el diagnóstico en base criterios de la exploración física y a exploraciones complementarias como la ecografía Doppler testicular. El análisis del seminograma se ha realizado por el laboratorio del centro de diagnóstico UDIAT mediante el sistema SCA (*Sperm Class Analyzer*). Tras la criopreservación del semen, el análisis de la fragmentación del ADN espermático y de la longitud telomérica se ha realizado en el laboratorio del centro CIMAB (*Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona*).

3.1.2 Diagnóstico

El diagnóstico de varicocele e infertilidad se ha realizado según los criterios establecidos en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Parc Taulí de Sabadell, en la consulta específica de Andrología:

Diagnóstico de varicocele según los siguientes parámetros:

- ▶ Anamnesis específica.
- ▶ Exploración física para diagnóstico de varicocele palpable o no palpable según la escala de Dubin (50).

- ▶ Ecografía escrotal para diagnóstico de varicocele ecográfico (dilatación de venas del plexo pampiniforme mayor a 3 mm).

Diagnóstico de Infertilidad según los siguientes parámetros:

- ▶ Anamnesis dirigida en busca de diferentes causas reversibles de infertilidad masculina.
- ▶ Infertilidad de pareja según la definición de la OMS (enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de concebir de forma espontánea durante el transcurso de 12 o más meses manteniendo relaciones sexuales no protegidas de manera regular (2)).
- ▶ Infertilidad masculina diagnosticada por alteraciones en el seminograma según los criterios del centro de diagnóstico UDIAT. Diagnóstico a partir de 2 muestras de semen separadas por los menos un mes y siguiendo los valores de referencia del manual de la OMS de 2010 (*Ver tabla 3.1*).
- ▶ Análisis de sangre en busca de causas reversibles de infertilidad o alteraciones hormonales.

Tabla 3.1: Valores umbral de normalidad

Parámetro	Valores de referencia
Volumen (en mL)	1,5
pH	$\geq 7,2$
Concentración de espermatozoides	15×10^6 espermatozoides / mL
Número total de espermatozoides	39×10^6 espermatozoides
Movilidad total (a + b) (en %)	32%
Morfología (% formas normales)	4%
Vitalidad (en %)	58%

*Valores por debajo de los descritos, se considerarían anormales

Fuente: Organización Mundial de la Salud (24)

3.1.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

Pacientes que consultaron por infertilidad y fueron diagnosticados de varicocele por exploración física y ecografía doppler testicular.

Una vez diagnosticados estos pacientes, según los criterios anteriormente descritos, se han dividido en dos grupos:

1. Grupo 1: Pacientes con varicocele clínico o palpable, con diagnóstico de varicocele ecográfico y alteraciones en el seminograma.
2. Grupo 2: Pacientes con varicocele subclínico o no palpable, con diagnóstico de varicocele ecográfico y alteraciones en el seminograma.

Criterios de exclusión:

- ▶ Ausencia de varicocele ecográfico.
- ▶ Varicocele recidivante.
- ▶ Presencia de infección del tracto genito-urinario.

- ▶ Pacientes con consumo habitual de fármacos o tóxicos que puedan alterar la línea de maduración espermática.
- ▶ Presencia de otras causas de infertilidad no relacionadas con el varicocele.

3.1.4 Grupos de pacientes y controles

Se incluyeron un total de 80 muestras de semen de 40 pacientes con alteraciones de la fertilidad. Las 80 muestras eran procedentes de 20 pacientes correspondientes al grupo 1 y 20 pacientes del grupo 2.

Tabla 3.2: Grupos de pacientes

Grupo	Estudio basal pre-tratamiento	Tratamiento	Primer control	Segundo control
1 (n=20)	Seminograma, fragmentación de ADN y longitud telomérica de ADN espermático basales	Microvaricocelectomía	Control 1º mes: Postquirúrgico	Control 9º mes: Seminograma, fragmentación de ADN y longitud telomérica de ADN espermático
2 (n=20)	Seminograma y fragmentación de ADN espermático basales	Tratamiento antioxidante oral	Control 3º mes: Seminograma y fragmentación de ADN espermático	

Fuente: Elaboración propia

Pacientes del grupo 1:

- ▶ Diagnóstico mediante seminograma de la infertilidad (muestra de semen 1). Análisis del seminograma, análisis de la fragmentación del ADN espermático y análisis de la longitud telomérica del ADN espermático previo a la intervención quirúrgica.
- ▶ Todos los pacientes del grupo 1 fueron intervenidos mediante varicocelectomía microquirúrgica siempre por el mismo primer cirujano y siempre utilizando la

misma técnica subinguinal microquirúrgica. Se realizó en todos los pacientes tras el rasurado y desinfección quirúrgica una incisión subinguinal, seguida de una apertura por planos hasta disección roma del cordón espermático por visión a cielo abierto. Posteriormente colocación de microscopio óptico de trabajo y disección de venas dilatadas del cordón, sección de las mismas y ligaduras con hilo de seda. Comprobación en todos los pacientes de la preservación del conducto deferente, los vasos linfáticos y los vasos arteriales cremastérico y deferencial. Finalmente cierre por planos con sutura reabsorbible y sutura de piel con ágrafes cutáneos.

- ▶ Control en Consultas Externas al mes de la intervención para revisión de correcta evolución.
- ▶ Control en Consultas Externas al 9º mes de la intervención quirúrgica: análisis de seminograma, análisis de la fragmentación de ADN espermático y análisis de la longitud telomérica del ADN espermático (muestra de semen 2).

Pacientes del grupo 2:

- ▶ Diagnóstico mediante seminograma de la infertilidad (muestra de semen 1).
- ▶ Tratamiento oral durante 3 meses con una combinación de antioxidantes mediante la fórmula de un tratamiento multivitamínico comercializado (Androferti®, *Q Pharma Laboratories; Alicante, Spain*) que contiene L-Carnitina (1500 mg), vitamina C (60 mg), coenzima Q10 (20 mg), vitamina E (10 mg), vitamina B9 (200 µg), vitamina B12 (1 µg), zinc (10 mg), y selenio (50 µg) al día.
- ▶ Análisis de seminograma y fragmentación de ADN espermático a los 3 meses del inicio del tratamiento (muestra de semen 2).

3.1.5 Consentimiento informado y comité de ética

Todos los procedimientos realizados han sido aprobados por el Comité Ético de investigación Clínica de la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell (CEIC). Protocolo y Hoja de información al Paciente v.1 de Enero de 2015, confirmado en su informe de 27 de Enero de 2015 con referencia: 2014676 (*Ver Anexo III*).

Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado y aceptaron que una parte de su muestra recogida, sería destinada a la investigación para el presente estudio (*Ver Anexo IV*).

En el grupo 1 de pacientes, se tomaron muestras de semen por masturbación antes y a los 9 meses del tratamiento quirúrgico del varicocele mediante varicocelectomía microquirúrgica. En este grupo de pacientes se incluyó un grupo control con 12 donantes de semen de fertilidad probada, procedentes de un programa de donación de esperma en convenio con la empresa CIMAB.

En el grupo 2 de pacientes, se tomaron muestras de semen por masturbación antes y a los 3 meses del tratamiento oral con antioxidantes.

3.2 Muestras de semen

3.2.1 Obtención de las muestras

Las muestras de semen, tanto de los pacientes del grupo 1, como de los pacientes del grupo 2, como de los controles fértiles (pertenecientes al grupo 1) se han obtenido mediante masturbación, tras un periodo de abstinencia sexual de entre tres y cinco días y se han procesado antes de 1 hora post recogida.

Las muestras han sido todas entregadas al laboratorio de inmunología del centro de diagnóstico UDIAT de la Corporació Sanitària Parc Taulí. En dicho laboratorio se han realizado los análisis del seminograma según los criterios anteriormente comentados y mediante el sistema SCA (Sperm Class Analyzer de Microptic®).

Todas las muestras analizadas se han recogido y criopreservado para su posterior análisis en el centro CIMAB, donde se ha realizado el análisis de la fragmentación de ADN espermático y de la longitud telomérica del ADN espermático. Para los pacientes del grupo 1 se incluyó un grupo control de 12 donantes de semen de fertilidad probada, procedentes de un programa de donación de esperma en convenio con la empresa CIMAB.

3.3 Técnicas de análisis del semen

3.3.1 Seminograma

Las muestras de semen humano, se han valorado mediante el seminograma convencional. Este estudio, permite clasificar a las muestras de semen según diferentes propiedades macroscópicas o microscópicas.

Mientras las propiedades macroscópicas del semen las caracteriza el técnico o investigador por observación directa. De entre estas características, las más importantes son el volumen de eyaculado, la licuefacción (completa o incompleta), el aspecto del líquido (transparente, translúcido u opaco), el color (blanco, blanco-amarillo, amarillento o marronoso) y en pH de la muestra.

Por otro lado, las propiedades microscópicas de la muestra de semen se analizan mediante el sistema Sperm Class Analyzer (SCA) de Microptic® (Microptic®, Barcelona, España). Este sistema proporciona datos respecto a la concentración de espermatozoides, la movilidad distribuida en cuatro categorías diferentes y la morfología de los espermatozoides, siguiendo los criterios de Kruger (criterio estricto de Kruger, 1987 (282)).

La OMS establece en sus recomendaciones de 2010, cuáles son los valores umbral para todas las características principales del semen considerados de normalidad, por debajo de los cuales, se consideraría que son valores anormales. Dichos valores se han comentado en la tabla 1 del apartado de introducción (24).

3.3.2 Criopreservación

La criopreservación de las muestras se ha realizado según un protocolo adaptado de otros autores, como Chernos y Martin de 1989, con adaptaciones posteriores de autores como García-Peiró y cols de 2012.

3.3.2.1 Medio de criopreservación

El medio de criopreservación utilizado contiene:

- ▶ 56 mL de agua miliQ.
- ▶ 30 mL de yema de huevo.
- ▶ 1,72 gr de citrato sódico.
- ▶ 1,98 gr de glucosa.
- ▶ 14 mL de glicerol.
- ▶ 2 gr de glicina.

Para la preparación de este medio, se separan las claras de la yema del huevo y se obtienen 30mL de yema de huevo sin la tela que la envuelve. Posteriormente se homogeneizan en un vaso de precipitado, y se añade el citrato sódico, la glucosa, el agua miliQ y el glicerol. El glicerol actúa como criopreservante, evitando que las membranas celulares plasmáticas se fragmenten durante la congelación, así, no se formarán cristales de agua. Una vez que la muestra anterior es homogénea, se incuba en un baño de agua a 56°C y durante 30 minutos para que se produzca la inactivación de las proteínas de la yema de huevo. Una vez pasado ese tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añaden 2 gr de glicina, se homogeneiza la muestra y se ajusta el pH de la misma en valores de entre 7,2 y 7,4. Finalmente se guarda en tubos de centrifuga de 5mL (para facilitar su manipulación y mantenimiento) a una temperatura de -20°C. Se aconseja, en líneas generales, no sobrepasar los 3 meses de congelación tras su preparación.

3.3.2.2 Criopreservación en Test-Yolk-Butter (TYB)

Una vez obtenida la muestra de semen, se deja licuar durante 30 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, se mide el volumen de semen licuado con una pipeta. La muestra se transfiere a un tubo estéril y se añade, mientras se va agitando, gota a gota el líquido de criopreservación hasta llegar a un volumen en proporción 1:1. Finalmente las muestras homogéneas se transfieren a criotubos resistentes a la congelación de 0,5mL y se congelan a -80°C en un baño de isopropanol unas 6h y finalmente se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

3.3.2.3 Descongelación y lavado de las muestras de semen

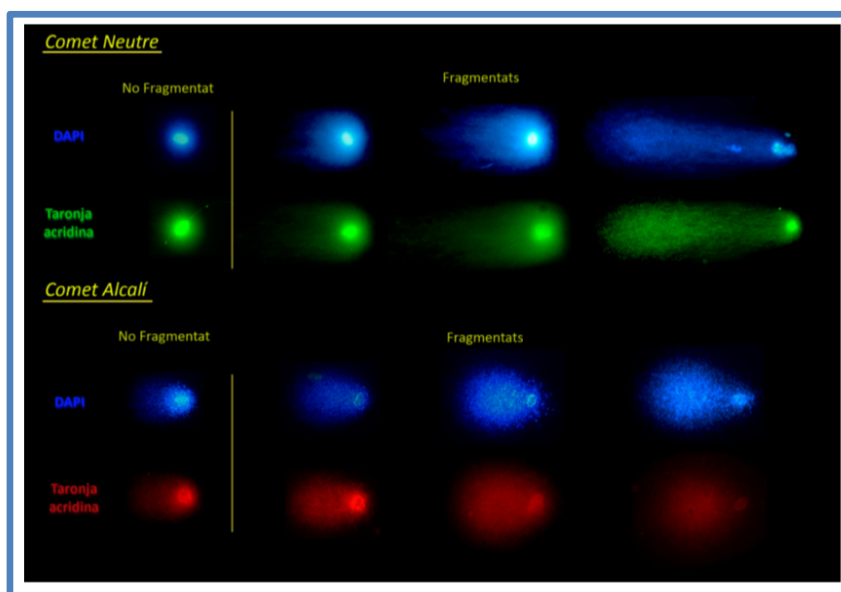
En el momento antes de realizar el análisis (sea cual sea la técnica a utilizar), se descongelan las muestras mediante su inserción en agua a 37°C durante 30 segundos y posteriormente se dejan a temperatura ambiente hasta que estén licuadas. De inmediato, se recoge la muestra con una pipeta y se diluye con un tampón salino fosfato (PBS), que no contenga ni Calcio ni Magnesio, en una proporción 1:3. A continuación, se centrifuga la mezcla a 400g durante 4 minutos. Tras esta operación, se decanta el sobrenadante y se repite la operación consecutivamente dos veces más. Finalmente, se resuspende el botón celular en PBS, ajustándose la concentración final de espermatozoides al valor deseado, que suele estar comprendida para el estudio del ADN espermático, entre 5 y 10 millones de espermatozoides por cada mililitro.

3.4 Fragmentación de ADN espermático

3.4.1 Análisis de fragmentación de ADN espermático: Ensayo Cometa (COMET ASSAY)

El ensayo Cometa se basa en una descondensación completa de la cromatina, acompañada de una electroforesis en condiciones alcalinas o neutras. Utilizando las condiciones neutras, las colas de Cometa muestran los espermatozoides fragmentados con rotura de doble cadena de ADN. En condiciones alcalinas, se evalúan las roturas de cadena simple del ADN espermático (*Ver Figura 3.1*).

Figura 3.1: Criterios de clasificación de los espermatozoides según su fragmentación de ADN espermático mediante Comet neutro y Comet alcalino



Fuente: CIMAB (Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona), Ribas-Masnou y cols (283)

3.4.1.1 Soluciones necesarias

- ▶ Portaobjetos tratados con una capa de agarosa que tenga un bajo punto de fusión. Se sumergen en una solución de dicha agarosa al 1% con agua miliQ. Posteriormente se dejan secar al aire ambiente encima de un papel de filtro.
- ▶ Solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en agua miliQ.
- ▶ Solución de tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x: Se realiza una dilución 1:10 en agua miliQ de la solución TBE 10x (Bio-rad®, Hércules, CA, USA).
- ▶ Solución de tampón PBS 1x: Se realiza una dilución 1:10 en agua miliQ de la solución PBS 10x. Dicha solución de PBS 10x contiene 1,37M de NaCl, 27 mM de KCl, 100mM de Na₂HPO₄-2H₂O, 20mM de KH₂PO₄ ajustada a pH 7,4.
- ▶ Solución de Lisis 1: Se prepara una solución en agua miliQ que contiene 0,4M de Tris-HCl 0,8M de DTT y 1% de SDS ajustada a pH 7,5.
- ▶ Solución de Lisis 2: Se prepara una solución en agua miliQ que contiene 0,4M de DTT, 2M de NaCl y 50mM de EDTA ajustada a pH 7,5.

- ▶ Solución de NaCl al 0,9%: Se prepara una solución de NaCl al 0,9% en agua miliQ, pesándose 4,5 gr de NaCl por cada 500 mL de agua.
- ▶ Solución alcalina fría: Se prepara una solución en agua miliQ conteniendo 30mM de NaOH y 1M de NaCl. El pH de esta disolución queda ajustado al mezclar dichas cantidades con exactitud. Esta solución se guarda a 4°C debido a que se tiene que utilizar en frío.
- ▶ Solución de neutralización: Se prepara una solución en agua miliQ que contiene 0,4M de Tris-HCl ajustando el pH a 7,5.
- ▶ Etanoles al 70%, 90% y 100%.
- ▶ Solución de electroforesis alcalina: Se prepara una solución 10x mediante una disolución de 300mM de NaOH en agua miliQ. Para obtener la solución 1x se diluye a proporción 1:10 en agua miliQ.

3.4.1.2 Protocolo

En primer lugar, es importante comentar que todas las incubaciones y técnicas del ensayo Cometa se realizan con el portaobjetos en posición horizontal.

▶ Preparación de la muestra y lisis de los espermatozoides:

Primeramente se ajusta la concentración de espermatozoides de la muestra a alrededor de 2 millones por mL. Se realiza mediante una cámara de Neubauer® o bien, observando unos 4 o 5 millones de espermatozoides por campo con un microscopio a 400 aumentos.

Ajustada esta concentración, se licua la alícuota de 0,5mL de agarosa con un bajo punto de fusión y se mezclan 25µL de la muestra y 50 µL de agarosa de bajo punto de fusión, que ha sido temperada a 37°C. De inmediato, se colocan 10µL y 15µL de la mezcla sobre dos portaobjetos tratados con agarosa de bajo punto de fusión y se cubren con dos portaobjetos. Uno de ellos será destinado al análisis Cometa alcalino y el otro para el Cometa neutro.

Se deja gelificar la agarosa sobre una placa metálica a 4°C durante unos 5 minutos y finalmente se retiran los portaobjetos que hacían de la parte superior. De manera inmediata,

antes de que la agarosa pueda secarse, se sumergen los portaobjetos en las soluciones de lisis 1 y lisis 2 durante 30 minutos en cada una. La solución lisis 1 provoca una digestión de la membrana plasmática del espermatozoide mediante el gel SDS y una reducción de los puentes disulfuro que están presentes en las protaminas que empaquetan el ADN. La solución de lisis 2, mediante en NaCl, neutraliza la unión de las protaminas al ADN espermático, de manera que quedan las protaminas en solución y el ADN desnudo, formando un halo de dispersión alrededor del core o núcleo.

Tras la incubación de las muestras en las dos soluciones de lisis, se realiza durante 10 minutos un lavado con la solución de TBE.

▶ Electroforesis:

Esta etapa es diferente dependiendo de si se realiza un análisis de Cometa alcalino o de Cometa neutro.

En el caso del Cometa Alcalino, previo a la electroforesis, se realiza una incubación en la solución salina fría durante 2,5 minutos a 4°C para proceder a desnaturalizar en ADN. Finalmente se realiza la electroforesis mediante un tampón salino, la solución de electroforesis alcalina, a 1V/cm durante 4 minutos.

En el caso del Cometa Neutro, la electroforesis se realiza en un tampón salino de TBE a 1V/cm durante 12,5 minutos en una cubeta Horizon® (GE Healthcare; Uppsala, Sweden). Posteriormente se sumerge el portaobjetos durante 2 minutos en NaCl al 0,9%.

▶ Fijación:

Para la fijación, los portaobjetos tanto del Cometa alcalino como del neutro, reciben el mismo tratamiento.

En primer lugar, se realiza una incubación en la solución de neutralización durante 5 minutos y, finalmente, se procede a una deshidratación progresiva con etanoles crecientes a 70%, 90% y 100% durante 2 minutos en cada uno. Para finalizar, se dejan secar las muestras horizontalmente a temperatura ambiente.

3.4.1.3 Análisis por microscopia de fluorescencia

La tinción de los portaobjetos se realiza mediante un agente intercalante de ADN. En este caso concreto, se utiliza el agente DAPI SlowFade Gold Antifade® (Invitrogen; Eugene, OR, USA), que contiene un agente que es protector de la fluorescencia. Una vez finalizada la tinción, se analizan 400 espermatozoides en el microscopio de fluorescencia (Olympus AX70®; Olympus Optical Co.; Hamburg, Germany). Al analizarlos, se clasificarán en fragmentados o no fragmentados, siguiendo los criterios de Ribas-Masnou y cols (*Ver Figura 4.1*).

De ese análisis, se extraerá cuál es el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN.

3.5 Medida de la longitud telomérica

3.5.1 Descongelación y lavado

El proceso de descongelación y lavado de las muestras, es el mismo tanto si se realiza un análisis de la fragmentación de ADN, como si se realiza una medida de la longitud telomérica del ADN espermático. En el apartado anterior de criopreservación. En resumen: Las muestras, una vez licuadas y descongeladas tras su inserción durante 30 segundos en agua a 37°C, se lavan con el tampón PBS y se va diluyendo con agua miliQ hasta que su concentración es de 1×10^6 espermatozoides por cada mL.

3.5.2 Fijación y extensión celular

Posteriormente a la descongelación y el lavado, se mezcla en proporción 1:2 con agarosa al 1% de bajo grado de fusión (Sigma®; Aldrich, USA). Seguidamente, 5µL de la mezcla final se añaden a un portaobjetos tratado con agarosa de bajo punto de fusión, y deja gelificar sobre una placa metálica a 4°C. De manera inmediata, antes de que la agarosa pueda secarse, se sumergen los portaobjetos de manera horizontal en un tampón de lisis (Halotech®, España) durante 25 minutos y posteriormente se lava con una solución neutra (100mM Tris-HCl; pH 7,5) durante 5 minutos.

Finalmente, los portaobjetos se deshidratan en series crecientes de etanol, al 70%, el 90% y el 100% durante 2 minutos en cada uno y se dejan secar al aire ambiente sobre un papel secante de manera horizontal.

3.5.3 Descompactación de la cromatina espermática

La dispersión y descompactación de la cromatina espermática se ha realizado en condiciones de pH neutro, siguiendo el protocolo descrito por Fernández y cols en 2005 con algunas leves modificaciones (284).

Tras los pasos anteriores, en que se ha dejado al ADN espermático sin su protección natural. Tras la dispersión del ADN, se produce la descompactación de la cromatina espermática. Se realiza mediante la sumersión de los portaobjetos en un tampón con 0,5M de NaOH durante 4 minutos y posteriormente deshidratado con dosis crecientes de etanol (al 70%, 90% y 100%) durante 2 minutos en cada uno y finalmente secado en horizontal a temperatura ambiente.

3.5.4 PNA-qFISH

Entonces, se añade al portaobjetos 1 μ L de una sonda específica denominada PNA-FICT (CCCTAAA) (*TelC-FITC, Panagene, Korea*) y se mezcla con 83 μ L de tampón de hibridación, que contiene 10mM de Na₂HPO₄, 20mM de Tris HCl y 70% de Foramida (amida derivada del ácido fórmico) en un pH de 7,4, y la mezcla se calienta a 72°C durante 6 minutos. Seguidamente, 15 μ L de la sonda PNA-FICT se añaden a cada portaobjeto y se cubren con un cubreobjetos. La hibridación de los componentes se deja actuar durante una hora a temperatura ambiente, en condiciones de alta humedad y oscuridad. Los portaobjetos se sumergen en 3 soluciones consecutivas de lavado a pH 7,2:

1. PBS + 0,1% de polisorbato 20 (Tween20®) 2 minutos a temperatura ambiente.
2. PBS + 0,1% de polisorbato 20 (Tween20®) durante 20 minutos a 48°C.
3. 2xSSC + 0,1% de polisorbato 20 (Tween20®) durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, los portaobjetos se deshidratan en dosis crecientes de etanol (a 70%, 90% y 100%) y se dejan secar a temperatura ambiente en posición horizontal.

3.5.5 Análisis de fluorescencia

La intensidad de fluorescencia para el cálculo de la longitud telomérica se ha realizado capturando la imagen de cada célula al tiempo de 1,8 segundos de exposición usando el microscopio de fluorescencia Eclipse® (E200, Nikon Inc., Japan) y se han analizado utilizando el software TFL-Telo (British Columbia Cancer Center, Canada) para el resultado de la longitud telomérica del ADN de cada célula analizada.

Para el control interno de la metodología de la hibridación, se ha realizado una muestra paralela a cada análisis proveniente de pacientes normozoospermicos.

La relación entre intensidad de fluorescencia y longitud telomérica se obtiene del análisis de las esferas resultantes del PNA-FITC. La relación fue validada, para la estimación correcta de la longitud telomérica en kb, en 90 células a partir de las 1301 células de la línea celular, y en 300 células espermáticas de los donantes de espermia normozoospermicos.

3.6 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando el *software Statistics Package for the Social Sciences*, versión 15 del *software* (SPSS; Chicago, IL, USA).

La significancia estadística se estableció en un intervalo de confianza del 95% para todos los análisis realizados.

Pacientes del grupo 1, relacionados con el objetivo 1 y 2:

Determinar el efecto del varicocele sobre la longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico.

Determinar el efecto de la microcirugía del varicocele sobre la fragmentación y longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable.

- ▶ Las variables de distribución normal fueron estudiadas utilizando el test Shapiro-Wilks.
- ▶ Para las variables que no seguían una distribución normal, se han utilizado tests no paramétricos.
- ▶ Para la comparación de los valores pre y post microvaricocelectomía, se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas.
- ▶ Las comparaciones entre diferentes grupos clínicos se realizaron mediante el test U de Mann-Whitney.
- ▶ Las correlaciones bivariadas se estudiaron mediante el test de Spearman.

Pacientes del grupo 3, relacionados con el objetivo 3:

Determinar el efecto del tratamiento antioxidante oral sobre la fragmentación de ADN espermático y valores del seminograma convencional en pacientes infértiles con varicocele subclínico o no palpable.

- ▶ Las variables de distribución normal fueron estudiadas utilizando el test Shapiro-Wilks.
- ▶ Para las variables que no seguían una distribución normal, se han utilizado tests no paramétricos.
- ▶ Para la comparación de los valores antes y después del tratamiento antioxidante, se utilizó el test de Wilcoxon para muestras pareadas.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados del primer grupo

4.1.1 Correspondientes a los objetivos 1 y 2

- ▶ Efecto varicocele sobre la longitud telomérica y efecto de la microcirugía del varicocele sobre la longitud telomérica y fragmentación de ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico.

Medición de la longitud telomérica en donantes fértiles y pacientes con varicocele:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los pacientes infértiles con varicocele clínico respecto a los donantes fértiles (*Ver Tabla 4.1*).

Tabla 4.1: Comparación de la LT entre pacientes infértiles con varicocele clínico y donantes de esperma fértiles

	Longitud Telomérica	Rango	<i>p</i> valor
Donantes fértiles	21,28 Kb	7,27	0,826
Varicocele clínico	20,10 Kb	11,41	

Medición de la longitud telomérica pre y post MV:

El análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas en LT antes (20,10 Kb (11,41)) y después de la MV (20,56 Kb (9,31)) ($p=0,533$). En la comparación de los pacientes post MV respecto a los donantes fértiles, tampoco se objetivaron diferencias ($p=0,484$) (*Ver Tabla 4.2*).

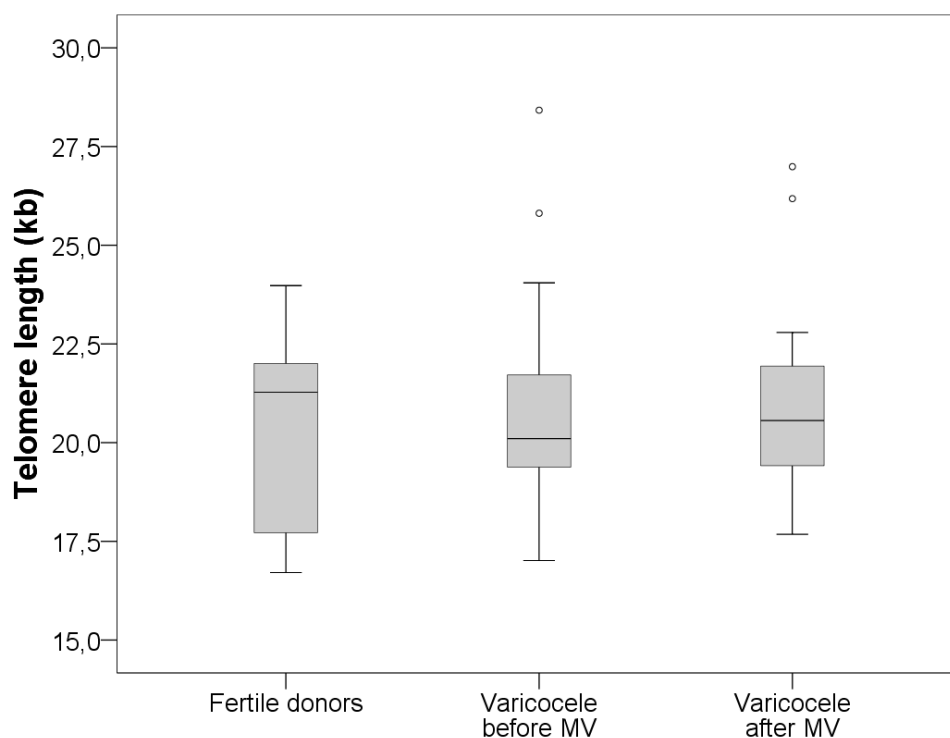
Tabla 4.2: Comparación de la LT entre pacientes infértiles con varicocele pre y post tratamiento con microvaricocelectomía

	Longitud Telomérica	Rango	<i>p</i> valor
Varicocele pre-MV	20,10 Kb	11,41	0,533
Varicocele post-MV	20,56 Kb	9,31	

La longitud telomérica absoluta se extrapoló de semen de donantes y de pacientes con varicocele clínico asociado a infertilidad, antes y después del tratamiento con MV. Los

valores tanto de donantes fértiles como del grupo de pacientes, tanto pre como post MV, se exponen en la figura 33 (*Ver Figura 4.1*).

Figura 4.1: Estimación de la LT absoluta (en Kb) para donantes fértiles y para pacientes con varicocele pre y post MV



Fragmentación de ADN espermático:

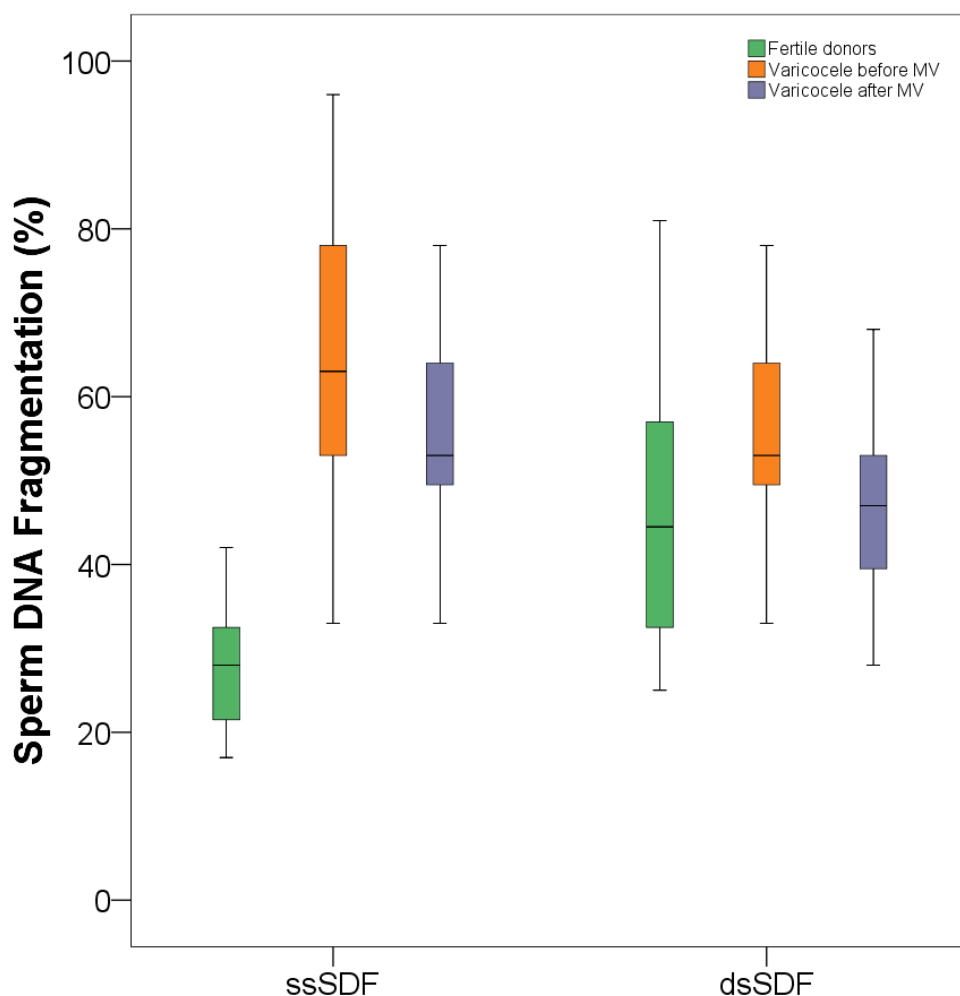
Los resultados de la comparación de las muestras de pacientes con varicocele pre y post MV mostraron un descenso en las cifras de fragmentación de ADN espermático, tanto de cadena simple como de cadena doble (*Ver Figura 4.2*).

- ▶ FADN de cadena simple: (pre y post MV): 68,5% (51,0) y 56,5% (44,0) respectivamente, $p=0,010$.
- ▶ FADN de cadena doble: (pre y post MV): 53,0% (45,0) y 47,0% (40,0) respectivamente, $p=0,007$.

Sin embargo, aunque los valores de FADN de cadena simple y doble fueron significativamente mejores post MV, los valores siguieron siendo significativamente mayores a los del grupo control de donantes fértiles.

- ▶ FADN de cadena simple: 28% (25), $p < 0,001$.
- ▶ FADN de cadena doble: 45% (56), $p = 0,039$.

Figura 4.2: FADN de cadena simple y doble (ssSDF y dsSDF, respectivamente) para pacientes con varicocele pre y post MV, y para donantes fértiles



Análisis de parámetros del seminograma:

Los pacientes con varicocele clínico presentaron una mejoría estadísticamente significativa en cuanto a los parámetros seminales tras la Microvaricolectomía (MV). Los valores en esperma mejoraron en los siguientes porcentajes (*Ver Tabla 4.3*):

- ▶ Concentración espermática: aumento del 31,6%.
- ▶ Movilidad progresiva: aumento del 56,3%.

- ▶ Vitalidad: aumento del 27,9%.

Tabla 4.3: Parámetros del seminograma en pacientes con varicocele clínico una semana antes y nueve meses después de MV (n=20). Valores representados en mediana (rango)

<i>Parámetro</i>	<i>Antes MV</i>	<i>Después MV</i>
Concentración (10 ⁶ /mL)	57.0 (154.0)	75.0 (253.0)*
Mobilidad A+B (%)	24.0 (64.0)	37.5 (81.0)*
Vitalidad (%)	59.0 (64.0)	75.5 (58.0)*

* Prueba de Wilcoxon con $p < .05$ en todas las evaluaciones

Nueva aproximación a la medición de la longitud telomérica a través de intensidad de fluorescencia:

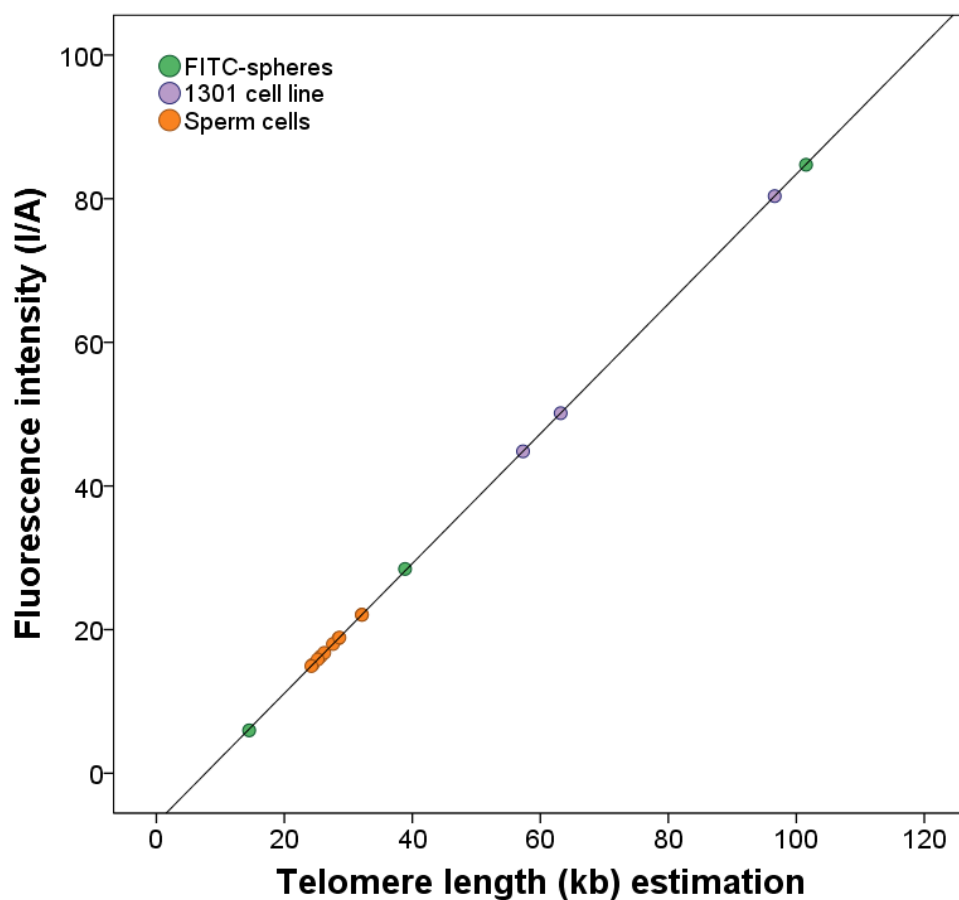
Los valores de la intensidad de fluorescencia (IF) de 100 esferas, junto con un conocido número de moléculas de Iso-Tio Cianato de Fluoresceína (FITC) adjuntas nos permite definir una ecuación lineal ($r^2=1$) (Ver Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Número de fluorocromos FITC adjuntos y medida de la IF de 3 grupos de esferas fluorescentes

<i>Grupo de esferas</i>	<i>Número de fluorocromos FITC</i>	<i>Intensidad de Fluorescencia (IF)</i>
1	806	5.980
2	2159	28.441
3	5640	84.729

Conociendo que una molécula de FITC se adjunta a 18 pares de bases de prueba, convirtiendo dicha ecuación con el objetivo de estimar la longitud telomérica (LT) absoluta en Kilobases (Kb): $LT (Kb) = 1,11 IF + 7,68$ (Ver Figura 4.3).

Figura 4.3: Relación entre IF y TL (Kb) (línea negra), obtenida a partir del análisis de esferas FITC (puntos verdes) ($r=1,00$)



*Esta relación fue validada estimando la LT (Kb) de 90 muestras de células de 1301 líneas celulares (puntos morados) y 300 células espermáticas de 10 donantes normozoospermicos (puntos naranjas)

4.2 Resultados del segundo grupo

4.2.1 Correspondientes al objetivo 3

- ▶ Efecto del tratamiento antioxidante oral sobre la fragmentación de ADN espermático y parámetros del seminograma convencional en pacientes infértiles con varicocele subclínico.

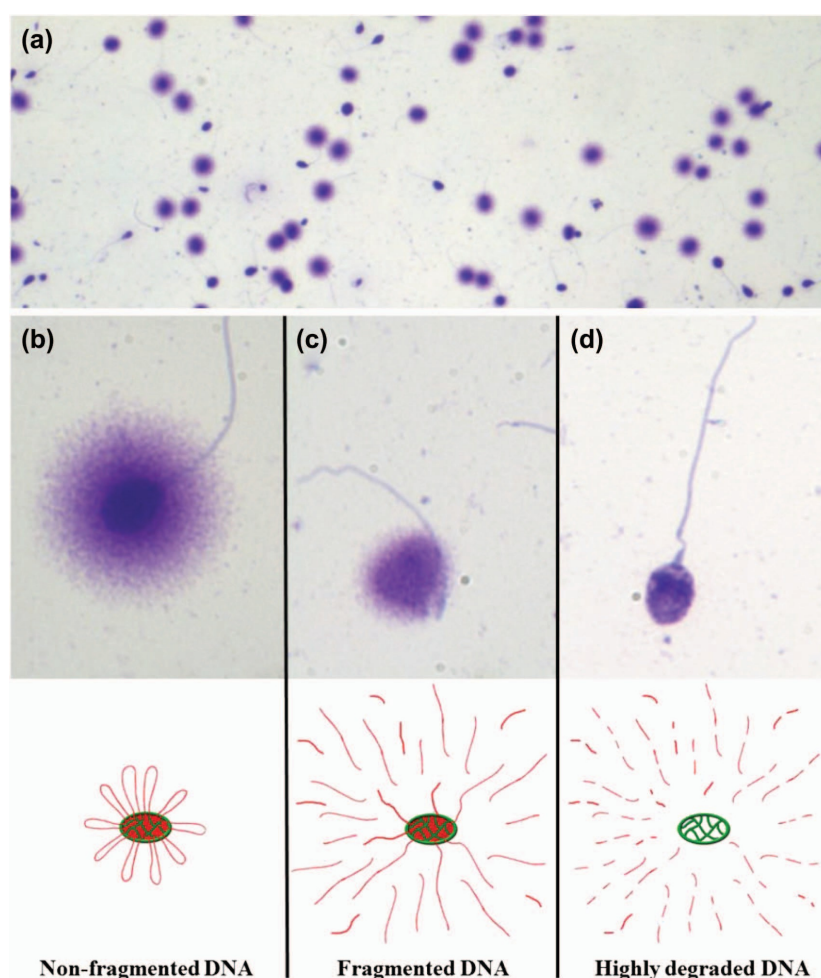
Análisis de la integridad del ADN espermático:

La fragmentación del ADN espermático (FADN) mostró una reducción estadísticamente significativa del 6,73% ($p=0,02$) tras el tratamiento antioxidante oral. Este dato representa una reducción del 22,1% de la FADN en relación al estado inicial de la muestra. El análisis

de los pacientes con un nivel más elevado de FADN se redujo tras en tratamiento en un 4,25% ($p=0,07$), lo que representa una reducción del 31,3% respecto al estado inicial de la muestra de DADN (Ver Tabla 4.5).

La imagen típica de dispersión de la cromatina espermática (SCD) se muestra de manera esquemática y mediante dicha técnica (Ver Figura 4.4).

Figura 4.4: Diferentes tipos de daño del ADN espermático mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD)



- Imagen del semen de una muestra de paciente con varicocele grado I
- Esperma con un gran halo de cromatina dispersada, indicativo de ADN intacto
- Cuando el ADN espermático presenta fragmentación, algunas cadenas no permanecen adheridas a la célula y aparecerán como difusas, lo que se refleja con el test SCD como un halo de ADN atado remanente
- Esperma con un “core” aberrante y la ausencia de halo refleja la masiva depreción de ADN, típico del ADN altamente degradado

Análisis de parámetros del seminograma convencional:

Los parámetros del seminograma convencional pre y post tratamiento con antioxidantes orales mostró una mejoría estadísticamente significativa en el recuento de espermatozoides del 63% ($p=0,04$). Sin embargo, el resto de parámetros no se vieron alterados (Ver Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Resumen de los principales valores del seminograma clásico en pacientes con varicocele grado I antes y después del tratamiento antioxidante oral

	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>3 meses después del tratamiento</i>	<i>p valor</i>
	<i>Media \pm DE; rango</i>	<i>Media \pm DE; rango</i>	
FADN (%)	30.38 \pm 13.32 (14.5–42.9)	23.65 \pm 7.5 (14.5–38.5)	0.02*
DADN (%)	13.55 \pm 6.21 (7.5–27.5)	9.3 \pm 2.78 (5.5–13)	0.07
mL ⁻¹ de esperma	71.14 \pm 51.2 (12–160)	109.65 \pm 108.77 (22–346)	0.21
Número total de espermatozoides	183.64 \pm 153.54 (28–480)	299.85 \pm 275.45 (90–750)	0.04*
Movilidad progresiva (%)	39.86 \pm 23.37 (9–89)	43.14 \pm 15.59 (18.3–66)	0.55
Vitalidad (%)	53 \pm 21.13 (23–90)	48.19 \pm 13.01 (40–78)	0.48
Morfología normal (%)	2.6 \pm 2.01 (0–6)	3.8 \pm 3.2 (0–10)	0.10

p<.05, estadísticamente significativos
DE: Desviación estándar

Tasas de embarazo:

De las 20 parejas infértiles, 2 de ellas consiguieron un embarazo espontáneo al finalizar el tratamiento.

El trabajo de investigación desarrollado ha generado dos publicaciones, las cuales se numeran a continuación y se adjuntan en el apartado de Anexos:

Artículo 1

Correspondiente a los objetivos 1 y 2.

Título: Microsurgical varicocelectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters.

Autores: Gual-Frau, Josep; Lara-Cerrillo, Sandra; Benet, Jordi; Abad, Carlos; Prats, Juan; Amengual, Maria José; Ribas-Maynou, Jordi; García-Peiró, Agustín.

Publicación: En revisión.

(Ver Anexo I)

Artículo 2

Correspondiente al objetivo 3.

Título: Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients

Autores: Josep Gual-Frau, Carlos Abad, Maria José Amengual, Naim Hannaoui, Miguel A. Checa, Jordi Ribas-Maynou, Iris Lozano, Alexandros Nikolau, Jordi Benet, Agustín García-Peiró, Juan Prats.

Publicación: Hum Fertil (Camb).2015 Sep;18(3):225-9.

doi: 10.3109/14647273.2015.1050462. Epub 2015 Jun 19.

(Ver Anexo II)

5. DISCUSIÓN

5.1 Discusión

5.1.1 Discusión respecto al objetivo 1

“Determinar el efecto del varicocele sobre la longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable”.

El aumento de estrés oxidativo se ha relacionado directamente con un acortamiento de los telómeros (285). Como se ha comentado, el varicocele produce un aumento del estrés oxidativo, siendo éste una de las causas principales de fragmentación de ADN espermático, esencialmente a través de modificaciones en la guanina, base nitrogenada más frecuente en la formación de los telómeros (175). Ante este hecho, nos planteamos que si el estrés oxidativo da lugar a alteraciones en la guanina, también podría dar lugar a alteraciones en la longitud telomérica en forma de acortamientos valorables, en pacientes con varicocele.

Los datos de los resultados recogidos en nuestra serie, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la longitud telomérica (LT) en una comparación entre donantes fértiles de semen y pacientes infértiles con varicocele clínico: longitud telomérica media de 20,10Kb en varicocele contra 21,28Kb en donantes fértiles, p valor de 0,826 (*Ver Tabla 4.1*).

Únicamente se han publicado dos estudios que relacionan el varicocele con la longitud telomérica. Hasta la actualidad, son los únicos trabajos revisados que estudian dicha relación y ambos presentan series limitadas de pacientes. Mientras en el estudio de Santana y cols (286), en consonancia con nuestros resultados, no se encontraron diferencias significativas en longitud telomérica entre varicocele y controles fértiles, en una muestra de 20 pacientes, de los cuales, sólo en 13 de ellos se pudo analizar la longitud telomérica; en el estudio de Tahamtan y cols (287) si se encontraron diferencias significativas, relacionándose el varicocele con un acortamiento telomérico de ADN, en una población de 18 pacientes, aunque estos resultados están basados según comenta el autor en poblaciones con diferencias significativas en cuanto a edad de los grupos estudiados.

La divergencia encontrada en estos trabajos en pacientes infértiles con varicocele y donantes fértiles puede ser debida a múltiples factores: Tamaño muestral, edad de los

grupos, técnicas de análisis, etc. Sin embargo, hay dos hechos que pueden jugar un papel en el mantenimiento de la longitud telomérica: En primer lugar, la presencia de la telomerasa durante la espermatogénesis, aunque su actividad se va viendo reducida a medida que progresa la meiosis (180); en segundo lugar, que algunas alteraciones presentes en los pacientes con varicocele, como son el estrés oxidativo, la hipertermia escrotal y la inflamación, han mostrado desencadenar la activación de la telomerasa, como un mecanismo natural de respuesta al daño del ADN (288). Estos hechos, nos plantean que la falta de reducción de la longitud telomérica espermática puede estar asociada a una respuesta al daño del ADN espermático mediada por la telomerasa, la cual podría proteger a la parte final del cromosoma de células germinales de su degradación. Esta hipótesis, debería ser validada en futuros estudios, analizando la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa en diferentes puntos de la espermatogénesis en pacientes infértiles con varicocele.

Consideramos que los resultados de nuestro trabajo, así como los resultados de los dos únicos estudios publicados anteriormente comentados, deberán ser reforzados con estudios con muestras más amplias y homogéneas, evitando la posibilidad de sesgos, sobre todo en edad de los pacientes.

5.1.2 Discusión respecto al objetivo 2

“Determinar el efecto de la microcirugía del varicocele sobre la fragmentación y la longitud telomérica del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable”.

En los resultados de nuestra serie no se han objetivado cambios en la longitud telomérica pre y post tratamiento con microvaricocelectomía (MV) en pacientes con varicocele clínico: LT antes (20,10 Kb (11,41)) y después de la MV (20,56 Kb (9,31)) ($p=0,533$) (*Ver Tabla 4.2*).

Sin embargo, sí que se han objetivado diferencias estadísticamente significativas en la comparación antes-después del tratamiento mediante microvaricocelectomía en cuanto a los parámetros del seminograma convencional: concentración espermática: aumento del

31,6%. movilidad progresiva: aumento del 56,3% y vitalidad: aumento del 27,9%, $p < 0,05$ (*Ver Tabla 4.3*), así como en la fragmentación tanto de simple como de doble cadena del ADN espermático: FADN de cadena simple: (pre y post MV): 68,5% (51,0) y 56,5% (44,0) respectivamente, $p = 0,010$. FADN de cadena doble: (pre y post MV): 53,0% (45,0) y 47,0% (40,0) respectivamente, $p = 0,007$ (*Ver Figura 4.2*).

En la literatura revisada no se han encontrado estudios publicados que informen del efecto del tratamiento quirúrgico del varicocele respecto a la longitud telomérica.

Como se ha comentado previamente, el efecto quirúrgico puede provocar una respuesta inflamatoria con activación de la telomerasa. Ésta sería una línea interesante de investigación.

La fragmentación de ADN espermático, se analizó mediante el ensayo Cometa, actualmente es la única técnica que permite distinguir entre fragmentación de cadena simple y de cadena doble.

Los resultados obtenidos mediante los análisis Cometa Alcalino, mostraron una reducción significativa de la fragmentación de ADN espermático de cadena simple tras la microvaricolectomía, esto coincide con estudios previos, donde la reducción de la fragmentación de ADN espermático fue estudiada utilizando diferentes técnicas de medida: TUNEL, SCSA o SCD (289, 290, 291).

Por otro lado, los resultados obtenidos con el Cometa Neutro mostraron que la microvaricolectomía (MV) se relacionó con una reducción significativa de la fragmentación de ADN espermático de doble cadena, siendo el primer estudio que revela este tipo de alteración (*Ver Figura 4.2*). Esto iría en consonancia con anteriores publicaciones (289), en las cuales, en las parejas con abortos de repetición, los hombres presentaban valores aumentados de fragmentación de doble cadena en comparación a donantes fértiles, por tanto, si en pacientes con varicocele la MV reduce los niveles de fragmentación de doble cadena, cabría esperar una reducción de la tasa de abortos espontáneos. No podemos aportar datos de los resultados reproductivos al no disponer

de seguimiento de estas parejas. Posteriores estudios serían necesarios para confirmar estas sospechas clínicas.

Se observa una mejoría significativa en los parámetros del seminograma convencional en los pacientes intervenidos, principalmente en concentración espermática, movilidad progresiva y vitalidad, con un aumento del 31,6%, 56,3% y 27,9%, respectivamente (*Ver Figura 4.3*). Estos resultados refuerzan la idea de que la MV es la técnica quirúrgica para el tratamiento del varicocele clínico con mejores resultados, como ya ha demostrado el metaanálisis de Cayan y cols (90).

5.1.3 Discusión respecto al objetivo 3

Determinar el efecto del tratamiento antioxidante oral sobre la fragmentación de ADN espermático y valores del seminograma convencional en pacientes infértiles con varicocele subclínico o no palpable.

En los pacientes con infertilidad asociada a varicocele subclínico, dadas las recomendaciones de las principales sociedades científicas de Urología, no se indica el tratamiento quirúrgico, puesto que empeora los parámetros seminales y aumenta la fragmentación de ADN espermático (125), sin existir indicaciones terapéuticas consensuadas.

Una revisión de 20 estudios clínicos sobre el uso de antioxidantes, mostró que 19 de esos estudios reportaron una reducción del estrés oxidativo (292). Existen en la literatura revisada varios complejos multivitamínicos que realizan combinaciones de antioxidantes y generan una mejoría en la calidad seminal, como se ha comentado en el apartado de antioxidantes de la introducción.

En nuestro estudio, el complejo multivitamínico utilizado estaba formado por: 1500 mg L-Carnitina, 60 mg vitamina C, 20 mg coenzima Q10, 10 mg vitamina E, 200 µg vitamina B9, 1 µg vitamina B12, 10 mg zinc, 50 µg selenio, es un compuesto comercializado con el nombre de Androferti® (*Q Pharma laboratorios, Alicante, Spain*), puesto que este complejo multivitamínico ha demostrado en varios estudios una mejoría en la mayoría de parámetros seminales. (289, 290, 291, 120, 116), sin embargo,

estos estudios se basan en pacientes con alteraciones seminales principalmente de causa idiopática, no específicamente por varicocele.

Los resultados presentados muestran diferencias estadísticamente significativas a favor del tratamiento con antioxidantes orales para la mejora de la integridad del ADN espermático, a través de una disminución en la fragmentación y de una mejoría en la concentración espermática en el seminograma convencional: mejoría estadísticamente significativa en el recuento de espermatozoides del 63% ($p=0,04$) (Ver Tabla 4.5).

En la literatura revisada al inicio de este trabajo, no encontramos estudios publicados sobre el uso de antioxidantes orales y su efecto en pacientes infértiles con varicocele subclínico.

Los resultados de nuestro trabajo han confirmado tanto una mejoría en la fragmentación de ADN espermático como en la concentración espermática del seminograma, corroborando el efecto beneficioso de su administración en pacientes infértiles con varicocele subclínico. Este hecho puede ser de gran ayuda a la hora de plantear un tratamiento integral de la infertilidad masculina que pueda ofrecer una opción terapéutica ante estos casos, obteniendo una mejoría de la fragmentación de ADN espermático Y abriendo una puerta al estudio de los efectos del tratamiento antioxidante respecto a la consecución de embarazos espontáneos o a la mejoría en los resultados de las técnicas de Fecundación In Vitro (FIV).

En la última revisión de la *Cochrane Library* de 2019 sobre el uso de antioxidantes en infertilidad se analizan, en un extenso metaanálisis, los efectos del tratamiento antioxidante sobre la fertilidad (293). En dicha revisión se analizaron 61 estudios iniciales incluyéndose 6.264 pacientes infértiles, con subfertilidad de factor masculino, como parte de una pareja que había sido remitida a un consultorio de fertilidad y que podría o no estar sometida a técnicas de reproducción asistida (TRA). De dichos pacientes, se incluyeron 3.803 en los grupos de intervención (tratamiento antioxidante) y 2.461 varones en los grupos control. El rango de edad fue de 18 a 65 años.

De los 61 estudios iniciales, 44 se incluyeron finalmente en el metaanálisis y solamente 12 de ellos informaban acerca de las tasas de embarazo o nacimientos.

Los resultados de dicha revisión van en consonancia con los resultados de nuestro estudio, en cuanto a mejoras: de valores de fragmentación del ADN espermático, la concentración espermática en el seminograma convencional, como en el porcentaje de embarazos espontáneos, dato que en nuestra serie, aun siendo una serie corta de pacientes, es del 10% (de las 20 parejas infértiles, 2 de ellas consiguieron un embarazo espontáneo al finalizar el tratamiento) y en la revisión de la *Cochrane Library* está entre el 12% y el 26%.

Respecto a la degradación de alta intensidad del ADN espermático (DADN), no se encontraron diferencias que logaran la significancia ($p=0,07$) (Ver *Tabla 4.5*), sin embargo, en este caso concreto, consideramos que, posiblemente una muestra de pacientes más amplia nos hubiera llevado a resultados más significativos.

En este estudio se ha demostrado que el tratamiento antioxidante oral aumenta la integridad del ADN espermático en pacientes infértiles con varicocele grado I. El próximo paso posiblemente sea investigar los beneficios potenciales que el tratamiento antioxidante tiene en la calidad del ADN espermático, identificando si tiene efecto sobre la DADN y, posiblemente llegando a mejorar los éxitos tanto a nivel de embarazo espontáneo, como por técnicas de reproducción asistida.

5.2 Limitaciones del estudio

Las limitaciones que se presentan en este trabajo, posiblemente se puedan aplicar a la mayoría de estudios de parejas infértiles:

- ▶ Dificultad para disponer de un grupo control, ya que el retraso que supondría en el deseo genésico, complica la realización de estudios en el que exista un grupo control al que no se aplique el tratamiento.
- ▶ Número limitado de pacientes en nuestra serie.
- ▶ No disponemos de seguimientos a largo plazo para comprobar los resultados reproductivos de las parejas infértiles que formaron parte del estudio.

5.3 Líneas de investigación futuras

A raíz de los resultados de nuestro trabajo, consideramos que se pueden plantear varias líneas de investigación que podrían ser interesantes en el futuro:

A nivel de la longitud telomérica en varicocele clínico o palpable:

- ▶ La falta de reducción de la longitud telomérica espermática puede estar asociada a una respuesta al daño del ADN espermático mediada por la telomerasa, la cual podría proteger a la parte final del cromosoma de células germinales de su degradación. Se precisarían estudios que analizaran la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa en diferentes puntos de la espermatogénesis en pacientes infértiles con varicocele.
- ▶ Plantear estudios sobre la relación entre varicocele y longitud telomérica, con muestras más amplias y homogéneas, evitando la posibilidad de sesgos, sobre todo en la edad de los pacientes.

A nivel del efecto de la microvaricocelectomía sobre la longitud telomérica:

- ▶ La activación de la telomerasa en procesos inflamatorios se podría producir por una respuesta inflamatoria al efecto del tratamiento quirúrgico. El análisis del efecto de la telomerasa pre y post cirugía podría ser una línea interesante de investigación.

A nivel del efecto de la MV sobre la fragmentación de ADN espermático:

- ▶ La MV ha demostrado una reducción de la FADN de doble cadena. Esta reducción podría relacionarse con una mejoría en los resultados reproductivos de las parejas, hecho que habría que investigar con posteriores estudios que incluyeran un seguimiento de las parejas tras la MV y averiguar los beneficios reproductivos del tratamiento.

A nivel del tratamiento antioxidante oral:

- ▶ La confirmación del efecto beneficioso del tratamiento antioxidante oral sobre la fragmentación de ADN espermático y la concentración espermática, plantea la opción de incluir dicho tratamiento en el caso de varicocele subclínico asociado a infertilidad. La mejora en los resultados reproductivos debería ser confirmada con estudios de muestras más amplias y con seguimientos más prolongados.
- ▶ Respecto a la degradación de alta intensidad del ADN espermático, en nuestro trabajo no se encontraron diferencias significativas secundarias al tratamiento antioxidante ($P=0,07$), sin embargo, en este caso concreto, consideramos que, posiblemente una muestra de pacientes más amplia nos hubiera llevado a resultados más significativos.

6. CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones

1. El análisis de la longitud telomérica en una serie de pacientes con varicocele clínico o palpable asociado a infertilidad, no ha mostrado diferencias en comparación a un grupo control de donantes fértiles.
2. La comparación de la longitud telomérica pre y post tratamiento con microvaricocelectomía no ha mostrado diferencias significativas en nuestra serie de pacientes infértiles con varicocele clínico o palpable. Después del tratamiento quirúrgico con microvaricocelectomía, los pacientes con varicocele clínico asociado a infertilidad presentan mejorías en los niveles de fragmentación de ADN espermático, tanto de cadena simple como de cadena doble.
3. El tratamiento antioxidante oral mejora los niveles de fragmentación de ADN espermático y el recuento de espermatozoides en el seminograma convencional en pacientes infértiles con varicocele subclínico o no palpable.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Robaire B, Chan P. Handbook of Andrology Segunda edición, 2010 American Society of Andrology.
2. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO manual for de standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
3. The practice commite of The American Society for Reproductive Medicine 2006.
4. Zegers-Hochschild F et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. Fertil Steril. 2017 Sep;108(3):393-406.
5. World Health Organization: Report of the Meeting on the Prevention of Infertility at the Primary Health Care Level. WHO, Geneva 1983, WHO/ MCH/1984.4.
6. Cates W, Farley TM, Rowe PJ: Worldwide patterns of infertility: is Africa different? Lancet 1985, 2:596-598.
7. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E. 2010;8:21.
8. Barrat CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, 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. Hum Reprod Update. 2017 Nov 1;23(6):660-680.
9. Report on varicocele and infertility: a committee opinion, Fertility and Sterility, Volume 102, Issue 6, 2014, Pages 1556-1560.
10. Jarow J, et al. Optimal Evaluation of the Infertile Male Reviewed and Validity Confirmed 2011. Unabridged version of this best practice statement.
11. Miller KD et al. Fertility after unilateral cryptorchidism: paternity, time to conception, pretreatment testicular location size, hormone ans sperm parameter. Horm Res. 2001;55(5):249-53.

13. Stahl P, Stember D, Goldstein M. Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med* 2012; 63:525-540.
14. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66:691–700. Erratum in: *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67:203.
15. Celsus AC. *Los ocho libros de la medicina*. Vol 2. Barcelona: Ed. Diamante; 1966.
16. Zorngiotti, A. W: «The spermatozoa count, a short history. *Urology*, 1975; 5: 672.
17. Macomber D.; Sanders, M. Di «The spermatozoa count». *N Engl J Med* 1929;200:81.
18. Jarow JP: Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 59–64.
19. Kornaunao, M. Martti, M. Sourante, H. Microvascular organization of the adult human testis. *Anat Rec*. 1971 May;170(1):31-9.
20. Fisiopatología del testículo infértil. Etiopatogenia del varicocele. *Archivos Españoles de Urología* 2004;57(9): 883-904.
21. Ahlberg N, Bartley O, Chidekel N. Right and left gonadal veins. An anatomical and stadistical study. *Acta Radiol Diagn* 1966;4:593.
22. Zollkoffer. Ch. L...: Fornanek. A.: Castañeda; Zúñiga; Amplaz. K.: Modified technique for embolization of the internal spermatic vein. En Secht, E. W.; Zeitler. E.: *Varicocele and male infertility*. Ed. Spriger verlag. Berlín, 1982.
23. Campbell-Walsh. *Urología*. 11ª edición: 2015; Ed. Panamericana.
24. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N. Retrograde contrast filling of the left gonadal vein. A roentgenologic and anatomical study. *Acta Radiol Diagn* 1965; 3: 385-392.

-
25. Nistal M, Redondo E. Varicocele, histología y etiopatogenia. En: III Congreso Nacional de Andrología. Zaragoza: ASESAs; 1987. 59-92.
 26. Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG. Varicocele. In: Lipshultz LI, Howards SS, eds. Infertility in the male. St. Louis, MO: Mosby Year Book; 1997:336-59.
 27. Clarke BG. Incidence of varicocele in normal men and among men of diferente ages. JAMA 1966; 198:1121-2.
 28. Wampler SM, et al. Common scrotal and testicular problems. Primary Care Clinics in Office Practice. 2010;37:613.
 29. World Health Organization "WHO laboratory manual for examination and processing of human semen" 5th ed. 2010.
 30. Garel, I.; Dubois J.; Rypens, F. y cols: "Anatomic variations of the spermatic vein and endovascular treatment of left varicoceles: a pediatric series". Can Assoc Radiol J 2004;55:39.
 31. Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: Cortisol and catecholamines. Fertil Steril 1974; 25: 88-95.
 32. Beck EM, Schlegel PN, Goldstein, M. Intraoperative varicocele anatomy: a macroscopic and microscopy study. J Urol 1992;148:1190.
 33. Dellamea MA, Sánchez LM, Cupelli Juan Correlación anatomo-radiológica del situs inversus totalis. Rev Posgrado la VIa Cátedra Med. 2009;(196):16-9.
 34. Shafik A, Khalil AM, Saleh M. The fasciomuscular tube of the spermatic cord. A study of its surgical anatomy and relation to varicocele. A new concept for the pathogenesis of varicocele. Br J Urol. 1972 Apr; 44(2):147-51.
 35. Zorgniotti A, MacLeod J. Studies in temperature, human semen quality and varicocele. Fertil Steril 1979; 24: 854-859.
 36. Lund L, Nielsen KT. Varicocele testis and testicular temperature Br J Urol 1996; 78, 1: 113-115.

-
37. Wright EF, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology*. 1997;50(2):257-9.
 38. Comhaire F, Vermeulen A. Testosterona plasmática en pacientes con varicocele e inadecuación sexual. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 824.
 39. Adamopoulos D et al. Hormone levels in the reproductive system of normospermic men and patients with oligospermia and varicocele. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59(3):447-52.
 40. WHO. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril*. 1992;57(6):1289-93.
 41. Weiss DB, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Steinberger E. Leydig cell function in oligospermic men with varicocele. *J Urol* 1978;120(4):427-430.
 42. Kilinc F, Kayaselcuk F, Aygun C, Guvel S, Egilmez T, Ozkardes H. Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor 1 alpha, vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the rat testis. *J Urol*. 2004;172(3):1188-91.
 43. Lee JD, Jeng SY, Lee TH. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the internal spermatic vein of patients with varicocele. *J Urol*. 2006;175(3Pt1):1045-8.
 44. Mali WP, Oei HY, Arndt JW, Kremer J, Coolsaet BL, Schuur K. Hemodynamics of the varicocele. Part II. Correlation among the results of renocaval pressure measurements, varicocele scintigraphy and phlebography. *J Urol*. 1986 Mar;135(3):489-93.
 45. Cockett AT, Takihara H, Iwamura M, Koshiba K. Pathophysiology of clinical varicoceles in infertile men. *Int J Urol* 1998; 5(2): 113-115.
 46. Restelli AE, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012;109(2):259-65.

-
47. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-16.
 48. Smith R, Vantman D, Ponce J, et al. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod.* 1996;11:1655-60.
 49. 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.
 50. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 1970;21:606–609.
 51. Lee J, Binsaleh S, Lo K, Jarvi K. Varicoceles: the diagnostic dilemma. *J Androl* 2008 Mar-Apr;29(2):143-6. Epub 2007 Dec 12.
 52. Cruz N. *Tratado de Andrología y Medicina Sexual.* 2012; Ed. Panamericana.
 53. Daith JA, Bedaiwy MA, Pasqualotto EB, et al. Varicocelectomy improves intrauterine insemination success rates in men with varicocele. *J Urol* 2001; 165:1510-3.
 54. Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, et al. *Guidelines on Male Infertility.* Arnhem, European Association of Urology, 2010.
 55. Álvarez E, García-Hidalgo E, Parga G, Gutiérrez ME. Angiogammagrafía escrotal. Diagnóstico del varicocele subclínico. *Actas Urol Esp* 1984; 8 (2): 129-133.
 56. Netto-Júnior NR, Lemos GC, Barbosa EM. The value of thermography and of the Doppler ultrasound in varicocele diagnosis. *Int J Fertil* 1984; 29: 176-179.
 57. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N, Fritjofsson A. Phlebography in varicocele escroti. *Acta Radiol Diagn* 1966; 4: 517-528.
 58. Hoekstra T, Witt MA. The correlation of internal spermatic vein palpability with ultrasonographic diameter and reversal of venous flow. *J Urol* 1995;153:82-84.

59. Baazeem A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011 Oct;60(4):796-808.
60. EAU Guidelines on Male Fertility 2016-2. Uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-Infertility-2016-2.
61. Dohle GR et al. The EAU Working Group on Male Fertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005;48:703-11.
62. Baker HWG. Male infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1994 Dec;23(4):783-93.
63. De Kretser DM. Male infertility. *Lancet* 1997; 349: 787.
64. Medicine PCoASfR. Report on varicocele and infertility. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):247-9.
65. Chen SS, Chen LK. Predictive factors of successful varicocelectomy in infertile patients. *Urol Int* 2011;86(3):320-4.
66. Jungwirth A et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324-32.
67. Sharlip ID, Jarow J, Belker AM, et al; Male Infertility Best Practice Policy Committee Members and Consultants: Infertility. Linthicum, American Urology Association, 2001.
68. Pasqualotto FF, Braga DP, Figueira RC, Setti AS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Varicocelectomy does not impact pregnancy outcomes following intracytoplasmic sperm injection procedures. *J Androl*. 2012 Mar-Apr;33(2):239-43.
69. Diamond A, Ravitz G. Venographic demonstration of a varicocele in a boy. *J Urol* 1975; 114: 640-641.

-
70. Janson R, Weissbach L. Zur Phlebographie der Vena Testicularis bei Varikozelenpersistenz bzw-rezidiv. Fortschr Röntgenstr 1978; 129: 485-490.
 71. Morag B, Rubinstein ZJ, Goldwasser B, Yerushalmi A, Lunnenfeld B. Percutaneous venography and occlusion in the management of spermatic varicoceles. Am J Roentgenol 1984; 143: 635-640.
 72. Laccarino V. A non surgical treatment of varicocele: transcatheter sclerotherapy of gonadal veins. Ann Radiol 1980; 23: 369-371.
 73. Piton J, Billerey J, Renou AM. Vascular thrombosis induced by direct electric current. Neuroradiology 1978; 16: 385-388.
 74. Hunter D, King N, Aeppli D. Spermatic vein occlusion with hot contrast material: angiographic results. J Vasc Interv Radiol. 1991 Nov;2(4):507-15.
 75. Tauber R, Johnsen N. Antegrade sclerotherapy for the treatment of varicocele: technique and late results. J Urol 1994; 151 (2): 386-390.
 76. Seyferth W, Jecht E, Zeitler E. Percutaneous sclerotherapy of varicocele. Radiology. 1981; 139: 335-40.
 77. Nieschlag E, Behre HM, Schlingheider A, Nashan D, Pohl J, Fishedick AR. Surgical ligation vs angiographic embolization of the vena spermatica: A prospective randomized study for the treatment of varicocele-related infertility. Andrologia 1993; 25: 233-237.
 78. Schoeneich G, Brändle E. Therapiealternativerhalten bei idiopathischer Varicocele testis. Aktuel Urol 1994; 25: 272-276.
 79. Belgrano E, Trombetta C, Liguori G. Scleroembolization techniques in the treatment of varicocele. Annal D'Urologie 1999; 33: 203-209.
 80. Ivannissevich O, Gregorini H. Una nueva operación para curar el varicocele. Sem Med (Buenos Aires) 1918; 25: 575-581.

81. Ribeiro EB. La tunnelisation dans le traitement du varicocele. *Presse Med* 1951; 59: 1687-1691.
82. Buntz C (citado por Dotson AL). En: *Urological Surgery*. Mosby Comp, St Louis, 1955; 754.
83. Jiménez Cruz JF, Allona Almagro A, Navío Niño S, Hernández C, Romero Aguirre C. Modificación de la técnica de Buntz en la cirugía del varicocele: resultados. *Acta Urol Esp*. 1963; 7: 401-404.
84. Bernardi R. New incision for therapy of varicocele: semiologic and surgical concepts. *Sem Med* 1942; 2: 165-192.
85. E. Broseta, A. Budía, J.P. Burgués y S. Luján. *Atlas Quirúrgico de Urología Práctica*. 2008. ENE Ediciones.
86. Palomo A. Radical cure of varicocele by a new technique. *J Urol* 1949; 61: 604-607.
87. Atassi O, Kass EJ, Steinert BW. Testicular growth after successful varicocele correction in adolescents: comparison of artery sparing techniques with the Palomo procedure. *J Urol* 1995; 153: 482-483.
88. Donovan JF, Winfield HN. Laparoscopic varix ligation. *J Urol* 1992; 147 (1): 77-81.
89. Maymar JL, Kim Y. Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. *J Urol*. 1994;152:1127-32.
90. Marmar JL, DeBenedictis TJ, Praiss D. The management of varicocele by microdissection of the spermatic cord at the external inguinal ring. *Fertil Steril* 1985; 43: 583-587.

-
91. Cayan S, SHavakhabov S, Kadioglu A. Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta-analysis to define the best technique. *J Androl*. 2009;30(1):33-40.
 92. Ishigami K, Ioshiyuki Y, Masao H, kikuo M. A new operation for varicocele: use of microvascular anastomosis. *Surgery* 1970; 67: 620-623.
 93. Cameron DF, Snyder FE, Ross MH. Ultrastructural alterations in the adluminal testicular compartment in men with varicocele. *Fertil Steril* 1980; 33: 526-530.
 94. Ando S, Giachetto C, Beraldi E, Panno ML, Lombardi A, Sposato G, Golpi G. The influence of age on Leydig cell function in patients with varicocele. *Int J Androl* 1984; 7: 104-118.
 95. Raboch J, Starka L. Hormonal testicular activity in men with a varicocele. *Fertil Steril* 1971; 22: 152-155.
 96. Comhaire F, Zalata A, Mahmoud A, Depuydt C. Pathophysiological effect of varicocele treatment. *Urologe A* 1998; 37: 251-253.
 97. Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM, Lipshultz LY. Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol* 1999; 162: 737-740.
 98. Stevens A, Lowe J, Young B. *Wheater Histopatología Básica. Atlas y texto en color. Cuarta edición. Ed Elsevier.*
 99. Edward C. Roosen-Runge. *The Process of Spermatogenesis in Animals. Developmental and Cell Biology 5. Cambridge University Press; Edición: 1 (29 de abril de 1977).*
 100. St John JC, Jokhi RP, Barrat CLR. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *Int J Androl* 2005;28:65-73.
 101. Lewis SEM, John Aitken R, Conner SJ, Luliis G, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted

-
- conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013;27:325-337
102. Barrat CLR, Aitken RJ, Björndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, Lewis SE, Perreault SD, Perry MJ, Ramos L, Robaire B, Ward S, Zini A. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications. A position report. *Hum Reprod.* 2010;Apr25(4):824-38.
103. Vandekerckhove F. Guidelines on sperm DNA fragmentation testing. *Transl Androl Urol.* 2017 Sep; 6(Suppl 4): S586–S587.
104. A. Jungwirth (Chair), T. Diemer (Vice-chair), Z. Kopa, C. Krausz, S. Minhas, H. Tournaye. EAU Guidelines on Male Infertility. 2019. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Barcelona 2019. ISBN 978-94-92671-04-2.
105. Ménéz Y, Dale B, Cohen M. Dna damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 2010;18;357-365.
106. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, AzzariC, et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med.* 2015;21:109-22.
107. Aitken RJ, De luliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;16:3-13.
108. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2014;28:684-703.
109. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rc* 1978;190:905-926.
110. Braun RE. Every sperm is sacred-or is it? *Nat Genet* 1998;18:202-204.
-

-
111. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997;138:2081-8.
 112. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizarro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-37.
 113. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004;6:59-65.
 114. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosálvez J, Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 2011;34:e546-553.
 115. Aitken RJ, De luliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009;32:46-56.
 116. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (ed) *Oxidative stress*. Pp 1-8;1985; Academic Press, London, UK.
 117. Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int J Androl* 2006;29:569-575.
 118. De Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarrilli S, Vita A, Colao A, Lombardi G. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with dysfunction of various origins. *Drugs R D* 2005;6:1-9.
 119. Mancini A, Milardi D, Conte G, Festa R, Marinis L De, Littarru GP. Seminal antioxidants in humans: preoperative and postoperative evaluation of coenzyme Q10 in varicocele patients. *Horm Metab Res* 2005;37:428-432.
 120. Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 2008;81(3):263-270.

-
121. Abad C, Amengual MJ, Gosálvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, et al 2012. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia*;45:211-216.
 122. Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, Bach M, Schechinger B, Herbert Zech N. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count and nuclear vacuolization. *Int J Vitamin Nutr Res* 2012;82:391-398.
 123. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45:215-225.
 124. Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 2010;16:23-29.
 125. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Amengual MJ, López-Fernández C, Gosálvez J, Benet J. Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J Androl.* 2012 May-Jun;33(3):361-7.
 126. García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011;95:105-109.
 127. Torregrosa N, Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Balleca JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum eprod* 2006;21:2084-2089.
 128. Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *Dna Cell Biol* 1997;16:1087-1097.

-
129. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* 2013;57(2-4):265-72.
 130. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzarro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ Nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 49:1083-1088.
 131. Henkel R, MaaB G, Jung A, Haidi G, Schill WB, Schuppe HC. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007;9:299-304.
 132. Weidner W, Pilatz A, Diemer T, Schuppe HC, Rusz A, Wagenlehner F. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol* 2013;31:717-723.
 133. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, Greco E. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*. 2015 Mar;3(2):265-70.
 134. Wilkins JR, Hundley VD. Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol* 1990;131:995-1008.
 135. Sanchez-Peña LC, Reyes BE, Lopez-Carrilo L, Recio R, Moran-Martinez J, Cebrian ME, Quintanilla-Vega B. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:108-113.
 136. Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment: a review. *Aust N Z J Obstetr Gynaecol* 2010;50:8-20.
 137. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996;19:323-337.

138. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(6):1400-1406.
139. Jeng SY, Wu SM, Lee JD. Cadmium accumulation and metallothionein overexpression in internal spermatic vein of patients with varicocele. *Urology* 2009;73(6):1231-1235.
140. Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden.Vrtovec H. Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *Int J Androl* 2008;31:557-564.
141. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007;15:514-519.
142. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril* 2013;100:1180-1186.
143. Hoyes KP, Lord BI, McCann C, Hendry JH, Morris ID. Transgenerational effects of preconception paternal contamination with Fe. *Rad Res* 2001;156:488-494.
144. Agarwal A, Deepinder F, Sherma RK, Range G, Li J. Effects of the cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril* 2008;89:128-128.
145. Jurewicz JI, Radwan M, Merez-Kot D, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Occupational, life stress and family functioning: does it affect semen quality? *Ann Hum Biol.* 2014 May-Jun;41(3):220-8.
146. Shefi S, Tarapore PE, Walsh TJ, Croughan M, Turek PJ. Wet heat exposure: a potentially reversible cause of low semen quality in infertile men. *Int Braz J Urol* 2007;33:50-57.
147. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop users. *Hum Reprod* 2005;20:452-455.

-
148. Zini A, Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? *Fertil Steril* 2011;96(6):1283-1287.
 149. Wang YJ, Zhang RQ, Lin YJ, Zhang RG, Zhang WL. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(3):307-314.
 150. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, Weber RF, Dohle GR. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol* 2013;189(1Suppl):S146-150.
 151. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia* 1999;31(5):277-282.
 152. Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L. Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum Reprod* 2001;16(3):534-539.
 153. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ. Evaluation of nuclear damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431-1436.
 154. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test, *J Androl* 2006;27:106-111.
 155. Salsabili N, Mehrsai A, Jalalizadeh B, Pourmand G, Jalaie S. Correlation of sperm nuclear chromatin condensation staining method with semen parameters and sperm functional tests in patients with spinal cord injury, varicocele and idiopathic infertility. *Urol J* 2006;3(1):32-37.

-
156. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasenzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia* 2008;40:245-251.
 157. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Effects of varicocelectomy on sperm DNA fragmentation, mitochondrial function, chromatin condensation, and apoptosis. *J Androl* 2012;33(3):389-396.
 158. Blummer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, Fraierrta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int* 2012;109(2):259-265.
 159. Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 2002;17(3):718-725.
 160. Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen IC, Chu YN. Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 2004;25(3):348-353.
 161. Bertolla RP, Cerdenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril* 2006;85(3):625-628.
 162. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21(4):986-993.
 163. Blummer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cerdenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 2008;90(5):1716-1722.
 164. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC. Apoptosis related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009;91(3):831-837.

-
165. El-Segini Y, Schill WB, Köhn FM, Zeid SA, Kaimshushy AA, Marzouk S. Assessment of sperm functions in infertile patients with varicoceles. *Andrologia* 2002;34(5):291-295.
 166. Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 2005;20(4):1018-1021.
 167. Werthman P, Wixon R, Kasperson K, Evenson DP. Significant decrease in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1800-1804.
 168. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, Fujisawa M. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int*. 2008 Jun;101(12):1547-52.
 169. Nasr-Esfahani MH, Abasi H, Razavi S, Ashrafi S, Tavalae M. Varicocelectomy: semen parameters and protamine deficiency. *Int J Androl*. 2009 Apr;32(2):115-22.
 170. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol*. 2008 Feb;179(2):639-42.
 171. Dada R, Shamsi MB, Venkatesh S, Gupta NP, Kumar R. Attenuation of oxidative stress & DNA damage in varicocelectomy: implications in infertility management. *Indian J Med Res*. 2010 Dec;132:728-30.
 172. Azadi L, Abbasi H, Deemeh MR, Tavalae M, Arbabian M, Pilevarian AA. Zaditen (Ketofiten), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelectomy. *Int J Androl* 2011;34(5):446-452.

173. Sadek A, Almohamdy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011;95(5):1705-1708.
174. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril* 2011;95(3):994-999.
175. Zini A, Azhar R, Baazeem A, Gabriel MS. Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. *Int J Androl* 2011;34(1):14-19.
176. Blackburn EH, Szostak JW. Molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann Rev Biochem* 1984;53:163-94.
177. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6:611–622.
178. Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Annals of Anatomy Sizing the ends : Normal length of human telomeres. *Ann Anat* 2010;192:284–291. Elsevier GmbH.
179. Thilagavathi J, Venkatesh S, Dada R. Telomere length in reproduction. *Andrologia* 2012;45:289–304.
180. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991 Apr 18;350(6319):569-73
181. Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 2013;99:23–29. Elsevier Inc.
182. la Roche C de. Alternative ends: Telomeres and meiosis. *Biochimie* 2008;90:181–189.

-
183. Ozturk S. Telomerase activity and telomere length in male germ cells. *Biol Reprod* 2015;92:1–26.
 184. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:99-106.
 185. Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E, Narayanan R. Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res* 1997;17:827-32.
 186. Nawaz S, Hashizumi TL, Markkhan NE, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases. *Am J Clin Pathol* 1997;107:542-7.
 187. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Harada M, Kubota Y. Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol* 1997;157:1161-5.
 188. Popli D, Sircar K, Chowdhry A. Telomerase: An exploration toward the end of cancer. *Indian J Dent Res.* 2017 Sep-Oct;28(5):574-584.
 189. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C and Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346: 725-730.
 190. Shiota K and Yamada S. Intrauterine environment-genome interaction and children's development (3): assisted reproductive technologies and development disorders. *J Toxicol Sci* 2009; 34 Suppl 2 : SP287-SP291.
 191. Bunduelle M, Liebaers I, Deketelaere V et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1883-1999). *Human reprod* 2002; 17 : 671-694.
 192. Ludwig AK, Katalinic A, Thyen U, Sutcliffe AG, Diedrich K and Ludwig M. Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection results of a prospective, controlled, single-blinded study. *Fertil Steril* 2009;91:115-124.

193. Marinelli D, Gaspari L, Pedotti P et al. Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *Int Hyg Environ Health* 2004;207:185-192.
194. Zhang Y, Wang H, Wang L, Zhou Z, Sha J, Mao Y, Cai L, Feng T, Yan Z, Ma L, Liu J. The clinical significance of sperm DNA damage detection combined with routine semen testing in assisted reproduction. *Mol. Med. Rep.* 2008;1:617-624.
195. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943;138:512-8.
196. Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Analysis of gene-specific DNA damage and single-strand DNA breaks induced by pro-oxidant treatment of human spermatozoa in vitro. *Mutat Res* 2003;529:21-34.
197. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J of Androl.* 2011; 13: 43-52.
198. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensten N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum reprod* 2001; 16: 2710-7.
199. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci.* 2019 Jan-Mar;12(1):4-18.
200. Showell MG, Brown J, Yardazi A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011, Issue 1.
201. Agarwal A and Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc* 2011;109:184-187.
202. De Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 2009;46:502-510.

-
203. Vernet P, Aitken RJ, Drevel JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2004;216:31-9.
 204. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil. Steril.* 99, 673–677.
 205. Omran HM, Bakhiet M, Dashti MG. DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility .*Mol Med Rep.* 2013 May;7(5):1631-5.
 206. Bailey RL, Gahche JJ, Lentino CV, et al. Dietary supplement use in the United States 2003–2006. *J Nutr.* 2011;141(2):261–266.
 207. Cuerda C, Luengo LM, Valero MA, Vidal A, Burgos R, Calvo FL. et al Antioxidants and diabetes mellitus: review of the evidence. *Nutr Hosp.* 2011 Jan-Feb;26(1):68-78.
 208. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briançon S. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med.* 2004 Nov 22;164(21):2335-42.
 209. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: U.S. Preventive services Task Force recommendation statement.*Ann Intern Med.* 2014 Apr 15;160(8):558-64.
 210. Mendiola J, Torres Cantero AM, Vioque J, et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertil Steril* 2010. 93: 1128-33.
 211. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997 ; 67: 142-7.

212. Ko EY, Sabanegh ES. The role of nutraceuticals in male fertility. *Urol Clin N Am* 2014;181-193.
213. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical prospective. *Hum Reprod Update* 2008;14:243-58.
214. Hammami S et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003;49-53.
215. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 1998;82:76-80.
216. Ross C, Morris A, Khairy M, Khalal Y, Braude P, Coomarasamy A et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility *Reprod Biomed Online* 2010;20:711-723.).
217. Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D et al. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J of Androl* 2011;13:690-697.
218. Lenzi A, Sgrò P, Salacone P, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004;81(6):1578-1584.morphology.
219. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79(2):292-300.
220. Zhou X, Liu F, Zhai S. effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007, 16. 383-90.
221. Sigman M, Glass S, Campagnone J, Pryor JL. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2006;85:1409-14.

-
222. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human reprod* 1995;10(1):110-115.
223. Dawson EB, Harris WA, Teter MC et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992;58:1034-9.
224. Abel BJ, Carswell G, Eiton R et al. Randomised trial of clomiphene citrate treatment and vitamin C for male infertility. *Br J Urol* 1982;54:780-4.
225. Hargreave TB, Kyle KF, Baxby K, Rogers AC, Scott R et al. Randomised trial of mesterolona versus vitamin C for male infertility. Scottish Infertility Group. *Br J Urol* 1984;56:740-4.
226. Alpers DH, Stenson WF, Taylor BE et al, editors. *Manual of nutritional therapeutics*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
227. Greco E, Lacobelli M, Rienzi L, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005 ; 26: 349-53.
228. Comhaire FH, Christophe AB, Zalata AA, Dhooge Ws, Mahmoud AM et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 159-65.
229. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el Mallik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530-7.
230. Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human reprod* 1999;14:1028-33.
231. Mora-Esteves C, Shin D. Nutrient supplementation: Improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med* 2013;31:293-300.

232. Prasad AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med Biol* 2006;20:3-18.
233. Omu AE, Al Azemi MK, Kehinde EO. et al. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract* 2008;17:108-16.
234. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA et al. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77:491-8.
235. Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM et al. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Human reprod* 2008; 23:1014-22.
236. Behne D, Gessner H, Wolters G, Brotherton J. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. *Int J Androl* 1988;11(5):415-423.
237. Vezina D, Mauffette F, Roberts KD, et al. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects in semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol trace Elem Res* 1996;53:65-83.
238. Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int J Gen Med* 2011;4:99-104.
239. Keskes-Ammar L, Feki-chakroun N, Rebai T et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003; 49(2):84-94.
240. Iwanier K, Zachara BA. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluids but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. *J Androl* 1995; 16: 441-7.

-
241. Hawkes WC, Alkan Z, Wong K. Selenium supplementation does not affect testicular selenium status or semen quality in north american men. *J Androl* 2009;30:525-533.
242. Robertson A et al. Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Regional Publications, European Series, No. 96.
243. Chen J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease: an endemic heart disease. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012;21(3):320-6.
244. Morales A, Cavicchia JC. Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue Cell*. 2002 Oct;34(5):349-55.
245. Gupta NP, Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility: a preliminary report. *Int Urol Nephrol*. 2002;34(3):369-72.
246. Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl*. 2005 Sep;7(3):257-62.
247. Pryor JP, Blandy JP, Evans P, et al. Controlled clinical trial of arginine for infertile men with oligozoospermia. *Br J Urol* 1978;50:47-50.
248. Schibona M, Mseschini P, Capparelli S, et al. L-Arginine and male infertility. *Minerva Urol Nefrol* 1994;46(4):251-3.
249. Srivastava S, Agarwal A. Effect of anion channel blockers on L-arginine action in spermatozoa from asthenospermic men. *Andrologia* 2010;42(2):76-82.
250. Gavella M, Lipovac V. Pentoxifylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa. *Andrología* 1992;24(1):37-39.
251. Pang SC, ChanPJ, Lu A. Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil Steril* 1993;60(2):336-343.

252. Okada H, Tatsumi N, Kanzaki M, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidoro S. Formation of reactive oxygen species by spermatozoa from asthenospermic patients: response to treatment with pentoxifylline. *J Urol* 1997;157(6):2140-2146.
253. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999 Nov;27(9-10):916-21.
254. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, et al. Placebo-controlled, double blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum reprod* 1993;8:1657-62.
255. Kodam H, Yamaguchi R, Fukuda J, et al. Increased oxidative desoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68:519-24.
256. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int J Androl* 1994;17:225-31.
257. Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996;65:411-9.
258. Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology* 2009;74:73-6.
259. Safarinejad MR, Safarinejad S. Efficacy of selenium and/or N-acetylcysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J Urol* 2009; 181(2):741-751.
260. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod*. 1991 Aug;6(7):987-91.

-
261. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D.J Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *Reprod Fertil.* 1993 Mar;97(2):441-50.
262. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1429-36.
263. Mancini A, Balercia G. Coenzyme Q10 in male infertility: physiopathology and therapy. *Biofactors* 2011 Sep-Oct;37(5):374-80.
264. Safarinejad MR. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *J Urol* 2009;182:237-48.
265. Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, Ricciardo-Lamonica G, Boscaro M, Lenzi A, Littarru G. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril.* 2009 May;91(5):1785-92.
266. Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, López G, Brassesco M, Carreras R, Checa MA. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Sep;30(9):1147-56.
267. Lenzi A, Gandini L, Maresca V, Rago R, Sgrò P, Dondero F, Picardo M. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2000 Mar;6(3):226-31.
268. Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. asthenozoospermic males. *Lipids.* 1999 Aug;34(8):793-9.
269. Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of

-
- seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr*. 2010 Feb;29(1):100-5.
270. Attaman JA, Toth TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, Chavarro JE. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Hum Reprod*. 2012 May;27(5):1466-74.
271. Safarinejad MR. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia*. 2011;43(1):38-47.
272. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002 Oct;56(8):365-79.
273. Lange H, Suryapranata H, De Luca G, Börner C, Dille J, Kallmayer K, Pasalary MN, Scherer E, Dambrink JH. Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24;350(26):2673-81.
274. Huang WJ, Lu XL, Li JT, Zhang JM. Effects of folic acid on oligozoospermia with MTHFR polymorphisms in term of seminal parameters, DNA fragmentation, and live birth rate: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Andrology*. 2019 May 24. doi: 10.1111/andr.12652. (Epub ahead of print).
275. Sirotkin AV, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol* 2014 Oct 15;741:230-6.
276. Song G, Kochman L, Andolina E, et al Beneficial effects of dietary intake of plant phytoestrogens on semen parameters and sperm DNA integrity in infertile men. *Fertil Steril* 2006;86:S49.
277. Chavarro JE, Toth TL, Sadio SM, Hauser R. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Hum Reprod*. 2008 Nov;23(11):2584-90.
-

-
278. Hamilton-Reeves JM, Vazquez G, Duval SJ, Phipps WR, Kurzer MS, Messina MJ. Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis. *Fertil Steril* 2010 Aug;94(3):997-1007.
279. Gual-Frau J, Abad C, Amengual MJ, Hannaoui N, Checa MA, Ribas-Maynou J, Lozano I, Nikolaou A, Benet J, García-Peiró A, Prats J. Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients. *Hum Fertil* 2015 Sep;18(3):225-9.
280. Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod.* 2005 Sep;20(9):2590-4.
281. Misell LM, Holochwost D, Boban D, Santi N, Shefi S, Hellerstein MK, Turek PJ. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J Urol.* 2006 Jan;175(1):242-6.
282. Ménézo Y, Evenson D, Cohen M, Dale B. Effect of antioxidants on sperm genetic damage. *Adv Exp Med Biol.* 2014;791:173-89.
283. Kruger TF, AckerSB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987;18:275-277.
284. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;27:652-658.
285. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez 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 Oct;84(4):833-42.

-
286. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jul;27(7):339-44.
287. Santana VP, Miranda-Furtado CL, Pedroso DCC, Eiras MC, Vasconcelos MAC, Ramos ES, Calado RT, Ferriani RA, Esteves SC, Dos Reis RM. The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases. *Syst Biol Reprod Med.* 2019 Apr;65(2):95-104.
288. Tahamtan S, Tavalae M, Izadi T, Barikrow N, Zakeri Z, Lockshin RA, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Sci Rep.* 2019 Mar 13;9(1):4336.
289. López-Díazguerrero NE, Pérez-Figueroa GE, Martínez-Garduño CM, Alarcón-Aguilar A, Luna-lópez A, Gutiérrez-Ruiz MC, Königsberg M. Telomerase activity in response to mild oxidative stress. *Cell Biol Int* 2012;36:409–413.
290. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortés P, Navarro J, Benet J. Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor. *PLoS One* 2012;7:e44679.
291. Cho C, 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;18:186–193.
292. Ni K, Steger K, Yang H, Wang H, Hu K, Zhang T, Chen B. A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno / oligozoospermic clinical varicocoele. *Andrology* 2016;4:816–824.
293. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human reproduction* 2011;26:1628-1640.
-

294. Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 14;3:CD007411

8. ANEXOS

ANEXO I

Artículo I

Microsurgical varicocelectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters.

Lara-Cerrillo, Sandra^{1*}; Gual-Frau, Josep^{2*}; Benet, Jordi³; Abad, Carlos²; Prats, Juan²; Amengual, Maria José⁴; García-Peiró, Agustín¹

1. CIMAB, Male Infertility Centre. 08192 Sant Quirze del Vallès, Barcelona, Spain.
2. Servei d'Urologia, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí – Universitat Autònoma de Barcelona, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain
3. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.
4. Centre Diagnòstic UDIAT, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí - UAB, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain.

*Authors contributed equally.

Corresponding Author

Agustín García-Peiró, PhD.

CIMAB, Male Infertility Centre/Center

08192 Sant Quirze del Vallès (Barcelona, Spain)

info@cimab.es

Abstract

Varicocele is one of the main causes of male infertility and microsurgical varicocelectomy (MV) seems to be the best procedure for its repair and to reduce testicular oxidative stress (ROS). As ROS causes guanine modifications, we postulated that DNA damage could be more intense in telomeres due to their G-rich nature. We studied the effect of MV on sperm telomere length (TL), single- and double-strand DNA fragmentation (ssSDF and dsSDF) and seminal parameters. Sperm telomeres from 12 fertile donors and 20 varicocele patients before and after MV were labelled using FITC-PNA qFISH after DNA dispersion. A new method to obtain absolute TL from relative fluorescence intensity was developed using FITC-fluorescent spheres. ssSDF and dsSDF were analysed using the alkaline and neutral Comet assays, respectively. The results showed that varicocele and MV had no effect on TL. Seminal parameters, ssSDF and dsSDF of varicocele patients were altered. Although these parameters improved after MV, values did not reach fertile donors results. A good estimation of absolute TL was developed based on FITC-fluorescent spheres. The results showed that TL may not be affected during varicocele, nor after surgery. However, MV is able to partially reduce altered seminal parameters, ssSDF and dsSDF values in varicocele patients.

Keywords

Varicocele, microsurgical varicocelectomy, sperm telomeres, sperm DNA fragmentation

Introduction

Infertility affects 15% of couples of reproductive age, with an equivalent incidence in men and women (Jungwirth et al., 2012). Varicocele is the main alteration of male fertility, affecting 15% of the general population, and is observed in 35% of primary and 81% of secondary infertility cases (Alsaikhan, Alrabeeah, Delouya, & Zini, 2016; Chiba, Ramasamy, Lamb, & Lipshultz, 2016; C. Cho, Esteves, & Agarwal, 2016; Jungwirth et al., 2012). Varicocele consists of the abnormal dilatation of the pampiniform venous plexus of the spermatic cords, which have been shown to increase their diameter from 0.5–1mm to 2mm using scrotal ultrasonography (Agarwal et al., 2016; Chiba et al., 2016). Inflammation occurs when the spermatic cord valves do not allow a correct blood flow (Alsaikhan et al., 2016; Cho et al., 2016), which has been shown to lead to scrotal hyperthermia, oxidative stress, hormonal disturbances, testicular hypoxia and toxic renal metabolite flow-back (Agarwal et al., 2016). These conditions are known to have a detrimental effect on testes histology, seminal parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) (Altintas et al., 2016; Cho et al., 2016; Smith et al., 2006), which could ultimately lead to impaired fertility (Alsaikhan et al., 2016; Cho & Seo, 2014). Surgical repair of varicocele, or varicocelectomy, is known to improve seminal parameters and SDF (Abdel-Meguid, Al-Sayyad, Tayib, & Farsi, 2011; Agarwal et al., 2007), and some studies have found an increase in reproductive chances (Kohn, Kohn, & Pastuszak, 2017; Pathak, Chandrashekar, Hakky, & Pastuszak, 2016). However, its effects on pregnancy rates are under discussion and still not proven, according to the Cochrane Collaborative 2012 (Kroese, De Lange, Collins, Evers, & Marjoribanks, 2012) and other recent studies (Marmar, 2016; Tiseo, Esteves, & Cocuzza, 2016). Among other techniques, such as

laparoscopic or retroperitoneal, microsurgical varicocelectomy (MV) is considered the best procedure for varicocele repair, as it allows the preservation of healthy vascular structures.

Telomeres are specialized nucleoproteins located at the ends of eukaryotic chromosomes, which consist of a variable number of G-rich tandem repeats (5'-TTAGGG-3' in vertebrates). The main function of telomeres is to protect chromosome ends, preventing them from being recognized as double-strand breaks by the DNA repair machinery. It is commonly accepted that TL in somatic human cells is 5–15kb (Blasco, 2005; Samassekou, Gadji, Drouin, & Yan, 2010) and 10–20kb in human sperm cells (Thilagavathi, Venkatesh, & Dada, 2012). Nevertheless, telomere shortening occurs naturally and leads to 50–200bp telomere loss during each round of DNA replication (Thilagavathi et al., 2012). Additionally, exonuclease activity and ROS produced during cell metabolism may also lead to telomere shortening (Kalmbach et al., 2013). Studies in mice showed that the progressive telomere shortening in *Terc*-knockout animals results in sterility and chromosomal alterations in offspring, which has been related to an increase in apoptosis, meiotic arrest and segregation errors during gametogenesis (de la Roche, 2008; Kalmbach et al., 2013). Further studies with human samples also showed that chromosomal abnormalities increase when telomeres are short (Ozturk, 2015), leading to apoptosis in male germ cells and meiotic arrest in female germ cells (Thilagavathi et al., 2012). In embryos, impaired TL may also lead to a higher risk of miscarriage, since it causes an abnormal development of the embryo, cytoplasmic fragmentation and apoptosis (Kalmbach et al., 2013; Ozturk, 2015; Thilagavathi et al., 2012). However, the effect of varicocele and MV on sperm TL is not clear. Only one recent study using RT-PCR has found differences in sperm TL between patients with varicocele and fertile men (Tahamtan

et al., 2019), while another study of the same year did not find a significant difference (Santana et al., 2019).

The present study aims to elucidate the effect of varicocele and MV on TL, SDF (differentiating between ssSDF and dsSDF) and seminal parameters. We also compared patient results to fertile donor values in order to determine the possible effect of varicocele and MV on male fertility.

Materials and methods

Samples

The study included sperm samples from 12 fertile donors from a semen bank as a control group which were cryopreserved in Test Yolk buffer. These men (age range: 25-36) did not present varicocele or other infertility impairments and had normal seminal parameters. Also, 20 patients (age range: 17–44) were recruited at Parc Taulí Hospital (Sabadell, Spain) when they presented clinical unilateral or bilateral grade II or higher varicocele detected by ultrasonography with a venous dilatation greater than 3mm and presence of blood flow reflux, had a diagnosis of infertility and were candidates for MV surgery. Exclusion criteria included evidence of urogenital infections, recurrent varicocele, absence of varicocele after physical examination and ultrasound or to be regular consumers of alcohol, drugs and tobacco. Both groups of samples were obtained by masturbation after three days of sexual abstinence. Patients samples were assessed for seminal parameters (concentration, motility and vitality) (WHO, 2010) and were cryopreserved using Test Yolk buffer until the TL and SDF analysis. The Corporació Sanitaria Parc Taulí ethics committee approved the study (Ref.: 2014676) and an informed consent was obtained from all participants.

Sperm chromatin dispersion and qFISH-PNA for telomere length analysis

Sperm chromatin was dispersed in neutral pH conditions following the protocol described by Fernández et al., 2005, with slight modifications. Samples were washed in PBS, diluted to a concentration of 1×10^6 sperm/mL and mixed 1:2 with low-melting-point agarose 1% (Sigma Aldrich; USA). Then, 5 μ L were added onto a slide, covered with a coverslip and jellified at 4°C. Slides were immersed in a lysis buffer (Halotech; Spain) for 25 minutes and washed in neutralization solution (100mM Tris-HCl; pH 7.5) for five minutes. Finally, samples were dehydrated in ethanol series (70%, 90% and 100%) for two minutes each and horizontally dried.

After DNA dispersion, samples were treated with 0.5M NaOH for four minutes, dehydrated and dried. Then, 1 μ L of probe (PNA-FICT (CCCTAA)₃, TelC-FITC, Panagene; Korea) was mixed with 83 μ L of hybridization buffer (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaCl, 20mM Tris-HCl and 70% Formamide; pH 7.4) and heated at 72°C for six minutes. Next, 15 μ L of the probe mix were added to each sample and covered with a coverslip. Hybridization was performed for one hour at room temperature in high humidity and dark conditions. Slides were immersed in three washing solutions at pH 7.2: i) PBS+0.1% Tween20 for two minutes at room temperature; ii) PBS+0.1% Tween20 for 20 minutes at 48°C; and iii) 2xSSC+0.1% Tween20 for two minutes at room temperature. Finally, samples were dehydrated and dried.

Fluorescence intensity was studied by capturing an image of each cell at 1.8 seconds of exposure using a fluorescence microscope (Eclipse E200, Nikon Inc.; Japan) and analysed using the TFL-Telo software (British Columbia Cancer Centre; Canada).

Absolute telomere length estimation approach

The following method was developed to obtain a relation between *fluorescence intensity* and *number of fluorochrome molecules* in order to extrapolate results to *absolute TL*.

Fluorescence analysis of a mix of spheres with different numbers of FITC fluorochromes attached (Sphero Calibration Particles Rainbow - RCPs; 8 peaks, 3.0–3.4 μ m, Spherotech; IL, USA) was performed using the same image-capturing conditions as qFISH-PNA. From the eight spheres groups of the kit, three were in the same fluorescence intensity range as sperm telomeres. These values were used to obtain a linear equation relating *arbitrary units of fluorescence intensity* to the *number of FITC-fluorochromes attached to the spheres* described on the data-sheet. Knowing that PNA probes for telomere labelling are 18bp long and attached to just one FITC molecule, the former equation was converted to relate *fluorescence intensity* and *absolute TL*. This equation was validated using the 1301 cell-line, derived from a human T-cell leukemia (telomeres ~70 kb) (Wang et al., 2013) (Sigma-Aldrich; USA) and sperm cells from 10 normozoospermic semen donors samples (telomeres 10–20kb) (Thilagavathi et al., 2012).

Alkaline and neutral Comet assays for ssSDF and dsSDF determination

The alkaline and neutral Comet assays were performed simultaneously on two different slides to assess ssSDF and dsSDF, respectively (Ribas-Maynou, García-Peiró, Abad, et al., 2012). Briefly, sperm samples were mixed with low-melting-point agarose, jellified at 4°C and were immersed in two consecutive lysis solutions. Neutral Comet electrophoresis was performed at 20V for 12.5 minutes in TBE buffer (pH 8.5) and alkaline Comet electrophoresis was performed at 20V for 4 minutes in 0.03M NaOH buffer (pH 12.2) after

a denaturing treatment. Slides were washed in neutralization solution, dehydrated and horizontally dried. Samples were stained with DAPI SlowFade Gold anti-fade (Invitrogen; OR, USA) and 400 sperm cells were classified as fragmented or non-fragmented following the criteria reported before (Ribas-Maynou, García-Peiró, Abad, et al., 2012).

Statistical analysis

As the obtained data did not show a normal distribution (Shapiro-Wilk test), non-parametric tests were applied. The Wilcoxon signed-rank test was used to find differences between samples before and after surgery. Comparisons between different clinical groups were performed using the Mann-Whitney U test. Bivariate correlations were studied through the Spearman test. All tests were considered significant with a confidence interval of 95%. All TL and SDF values represent *median (rank)* unless specified.

Results

Seminal parameters analysis

Varicocele patients presented a significant improvement in seminal parameters after MV (Table 1). Values of sperm concentration, progressive motility and vitality increased by 31.6%, 56.3% and 27.9%, respectively, compared to the sample before MV.

New approach to estimate absolute telomere length from fluorescence intensity

Fluorescence intensity (FI) values of 100 spheres with a known number of FITC molecules attached (Table 2) allowed us to define a linear equation ($r^2=1.00$). As one FITC molecule is attached to each 18bp probe, this equation was converted to estimate absolute TL: $TL(kb) = 1.11FI + 7.68$ (Figure 1).

TL from a total of 90 cells from three samples of the 1301 cell-line (~70kb) (Wang et al., 2013) and 300 sperm cells from 10 different normozoospermic donors (10–20kb) (Thilagavathi et al., 2012) was estimated using the former equation, obtaining a *mean* ± *SD* of 72.36 kb ± 21.21 and 26.1kb ± 2.89, respectively (Figure 1).

Telomere length in fertile donors and varicocele patients

Absolute sperm TL was obtained in donor samples and varicocele patient samples before and after surgery (Figure 2). Statistical analysis did not show any significant differences between TL before (20.10kb (11.41)) and after MV (20.56kb (9.31)) ($p=0.533$). When comparing varicocele patients before and after MV to fertile donor values (21.28 kb (7.27)), no statistical differences were found either ($p=0.826$ and $p=0.484$, respectively).

Sperm DNA fragmentation

When comparing varicocele samples before and after MV, results show a significant decrease in both ssSDF (68.5% (51.0) and 56.5% (44.0), respectively; $p=0.010$) and dsSDF (53.0% (45.0) and 47.0% (40.0), respectively; $p=0.007$) (Figure 3).

Nonetheless, even though ssSDF and dsSDF were significantly better after MV, values still significantly increased, as compared to the fertile donor group (28% (25) for ssSDF and 45% (56) for dsSDF) ($p<0.001$ and $p=0.039$, respectively).

Discussion

Microsurgical varicocelectomy effect on sperm quality

Varicocele patients show a detrimental environment in the testes due to different factors, such as increased levels of oxidative stress, scrotal hyperthermia and testicular hypoxia,

which can lead to seminal alterations and infertility (Agarwal et al., 2016). As a significant improvement in sperm quality has been found after surgery in terms of sperm concentration, motility and vitality (Table 1), our results are in agreement with previous studies (Abdel-Meguid et al., 2011; Pajovic et al., 2015; Zhang, Du, Liu, Qi, & Chu, 2014) supporting MV as a good method for varicocele repair.

New approach to measure absolute telomere length

While techniques such as qPCR analyse relative TL in a whole sample after DNA extraction, the qFISH-PNA technique allows the measurement of relative TL in individual cells and telomeres (Nussey et al., 2014). In both cases, obtaining absolute TL values may be challenging, since a control cell-line with known TL must be included in each experiment (Nussey et al., 2014). Unfortunately, these control cells are commonly derived from cancer cell-lines, which present chromosomal instability that could introduce a high experimental bias in the extrapolation from relative to absolute TL (Bakhoun & Compton, 2012). We analysed the 1301 cell-line, which is derived from human T-cell leukaemia and is normally used as an internal control in telomere measurements using flow cytometry (O'Callaghan & Fenech, 2011; Wang et al., 2013). Even our results showed a mean TL of 72.36kb, which is consistent with the literature, this value had a great dispersion among different samples (SD = 21.21 kb) (Figure 1).

To avoid this bias and to reach more reliable TL estimations, a new approach based on commercial and standard spheres with a known number of FITC-fluorochromes attached has been developed herein. This methodology allowed us to establish an equation relating *fluorescence intensity* and *absolute TL*, which is useful between 10-100kb. This equation

was validated using the 1301 cell-line (~70kb) (Wang et al., 2013) and human sperm cells (10–20kb) (Thilagavathi et al., 2012) (Figure 1). However, this approach should be adapted in each laboratory, since fluorescence analysis may vary between microscope technical characteristics and qFISH hybridisation conditions.

Sperm telomere length estimation

The primary aim of the present study was to analyze the effect of varicocele and MV on sperm TL, since telomere shortening has been related to meiotic arrest, an increase in chromosomal abnormalities in the embryo and a higher risk of miscarriage (Thilagavathi et al., 2012; Kalmbach et al., 2013). No TL differences were found between varicocele patients before and after surgery (Figure 2). These findings are consistent with recent studies showing the T/S ratio using q-PCR (Santana et al., 2019). As oxidative stress is increased in varicocele patients and is related to telomere shortening (Von Zglinicki, 2002), the absence of difference between varicocele samples and fertile donors seems to be conflicting. However, two facts may play a role in TL maintenance: first, telomerase has been demonstrated to be present during spermatogenesis, although its activity is reduced as meiosis progresses (Balmori & Varela, 2018; Kalmbach et al., 2013; Ozturk, 2015); and second, common alterations in varicocele, such as ROS, scrotal hyperthermia and inflammation, were shown to trigger the activation of telomerase as a natural response to DNA damage (López-Díazguerrero et al., 2012; Oyama et al., 2012). As a result, we postulate that the lack of reduction in sperm TL in varicocele patients could be associated with a DNA damage-response mechanism where telomerase protects chromosome ends from degradation in germ cells. This hypothesis should be validated in further studies

analyzing TL and telomerase activity in different spermatogenesis stages in varicocele patients.

DNA fragmentation analysis

The second main objective of the study was to analyze SDF using the Comet assay, as it is the only current technique to distinguish between ssSDF and dsSDF. Results obtained using the alkaline Comet showed a reduction in ssSDF after MV (Figure 3). This is in agreement with previous studies, where a reduction of SDF was also found using different techniques which correlate with alkaline Comet, such as TUNEL, SCSA or SCD (Cho et al., 2016; Ni et al., 2016; Ribas-Maynou et al., 2013a; Santana et al., 2019; Tahamtan et al., 2019). ssSDF was previously associated with oxidative damage and was demonstrated to have a negative effect on pregnancy achievement (Ribas-Maynou, García-Peiró, Fernandez-Encinas, et al., 2012). Therefore, the reduction in ssSDF after MV may lead varicocele patients to improve their chances of a natural pregnancy.

Results obtained using neutral Comet showed, for the first time, that the improvement in the testes environment by MV seems to also be effective in reducing dsSDF (Figure 3). According to previous publications (Ribas-Maynou, García-Peiró, Fernandez-Encinas, et al., 2012), recurrent miscarriage patients present increased dsSDF, as compared to fertile donors. Hence, if varicocele patients reduce their dsSDF levels through MV, a reduction of miscarriage risk should also be expected.

Even it would be expected to improve pregnancy changes and to reduce the risk of miscarriage, ssSDF and dsSDF values after nine months from surgery to treat varicocele are significantly worse than fertile donor results (Figure 3). To explain this situation, one

must consider: first, it is possible that nine months would not be enough to see the complete recovery of these patients, a fact that could be assessed by analyzing samples 12-18 months after MV; and second, the observed levels of SDF could be the greater improvement that is achievable through MV, either because this procedure is not able to completely reduce the pathological ROS levels, as it does not repair all of the affected veins, or because other factors apart from oxidative stress are triggering SDF.

As far as we are concerned, the effect of Varicocele and MV on absolute sperm TL, ssSDF, dsSDF and seminal parameters (concentration, motility and vitality) has been studied here for the first time. However, the sample size from both groups (Varicocele patients and fertile donors) is limited and one must consider these results as a first approach in this field. More studies with a larger number of patients studied would be necessary to corroborate our results.

Conclusions

A good estimation of absolute TL has been developed by applying a new qFISH-PNA approach based on commercial fluorescent spheres. This methodology, added to the study of SDF on varicocele patients, allowed us to conclude that MV did not cause variation in sperm TL, but it is able to partially reduce ssSDF and dsSDF and to improve seminal parameters.

Acknowledgements

This study was partially supported by the European Regional Development Fund (ERDF) and the Instituto de Salud Carlos III (Economy, Industry and Competitiveness Ministry,

Madrid, Spain) (Project PI14/00119). We thank Mr. Charles J. Simmons for the final English revision of the manuscript.

Authors contributions

SLC performed the experiments, participated in data analysis and manuscript writing, review and final approval. JGF, CA and JP performed the diagnosis and surgery of varicocele patients. JB contributed to the review and final approval of the manuscript. MJA contributed to sample collection and performed seminal parameter analysis. JRM and AGP contributed to the study design, analysis of data and manuscript writing, review and final approval.

References

- Abdel-Meguid, T. A., Al-Sayyad, A., Tayib, A., & Farsi, H. M. (2011). Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial. *European Urology*, *59*(3), 455–461.
- Agarwal, A., Deepinder, F., Cocuzza, M., Agarwal, R., Short, R. A., Sabanegh, E., & Marmar, J. L. (2007). Efficacy of Varicocelectomy in Improving Semen Parameters: New Meta-analytical Approach. *Urology*, *70*(3), 532–538.
- Agarwal, A., Sharma, R., Harlev, A., & Esteves, S. C. (2016). Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria: a systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*, *18*(2), 163–170.
- Alsaikhan, B., Alrabeeah, K., Delouya, G., & Zini, A. (2016). *Epidemiology of varicocele*. (18), 179–181.
- Altintas, R., Ediz, C., Celik, H., Camtosun, A., Tasdemir, C., Tanbek, K., ... Alan, C. (2016). The effect of varicocelectomy on the relationship of oxidative stress in peripheral and internal spermatic vein with semen parameters. *Andrology*, *4*(3), 442–446.
- Bakhoun, S. F., & Compton, D. A. (2012). Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1138–1143.
- Balmori, C., & Varela, E. (2018). Should we consider telomere length and telomerase activity in male factor infertility? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, (30), 1–6.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, *6*(8), 611–622.
- Chiba, K., Ramasamy, R., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2016). The varicocele: diagnostic dilemmas, therapeutic challenges and future perspectives. *Asian Journal of Andrology*, *18*(2), 276–281.
- Cho, C., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016). Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, *18*(2), 186–193.
- Cho, K. S., & Seo, J. T. (2014). Effect of Varicocelectomy on Male Infertility. *Korean Journal of Urology*, *55*(11), 703–709.
- de la Roche, C. (2008). Alternative ends: Telomeres and meiosis. *Biochimie*, *90*(1), 181–189.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., ... De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an

-
- improved sperm chromatin dispersion test. *American Society for Reproductive Medicine*, 84(4), 833–842.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., ... European Association of Urology Working Group on Male Infertility. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European Urology*, 62(2), 324–332.
- Kalmbach, K. H., Fontes Antunes, D. M., Dracxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., ... Keefe, D. L. (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertility and Sterility*, 99(1), 23–29.
- Kohn, T. P., Kohn, J. R., & Pastuszak, A. W. (2017). Varicocelelectomy before assisted reproductive technology: are outcomes improved? *Fertility and Sterility*, 108(3), 385–391.
- Kroese, A. C. J., De Lange, N. M., Collins, J., Evers, J. L. H., & Marjoribanks, J. (2012). Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1553–1555.
- López-Díazguerrero, N. E., Pérez-Figueroa, G. E., Martínez-Garduño, C. M., Alarcón-Aguilar, A., Luna-lópez, A., Gutiérrez-Ruiz, M. C., & Königsberg, M. (2012). Telomerase activity in response to mild oxidative stress. *Cell Biology International*, 36(4), 409–413.
- Marmar, J. L. (2016). The evolution and refinements of varicocele surgery. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 171–178.
- Ni, K., Steger, K., Yang, H., Wang, H., Hu, K., Zhang, T., & Chen, B. (2016). A comprehensive investigation of sperm DNA damage and oxidative stress injury in infertile patients with subclinical, normozoospermic, and astheno / oligozoospermic clinical varicocele. *Andrology*, 4(5), 816–824.
- Nussey, D. H., Baird, D., Barrett, E., Boner, W., Fairlie, J., Hartmann, N., ... Monaghan, P. (2014). Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(4), 299–310.
- O'Callaghan, N. J., & Fenech, M. (2011). A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biological Procedures Online*, 13(3), 1–10.
- Oyama, J., Maeda, T., Sasaki, M., Higuchi, Y., Node, K., & Makino, N. (2012). Repetitive hyperthermia attenuates progression of left ventricular hypertrophy and increases telomerase activity in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(10), 2092–2101.
- Ozturk, S. (2015). Telomerase activity and telomere length in male germ cells. *Biology of Reproduction*, 92(2), 1–26.
- Pajovic, B., Radojevic, N., Dimitrovski, A., Radovic, M., Rolovic, R., & Vukovic, M.
-

-
- (2015). Advantages of microsurgical varicocelectomy over conventional techniques. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(4), 532–538.
- Pathak, P., Chandrashekar, A., Hakky, T., & Pastuszak, A. (2016). Varicocele management in the era of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Asian Journal of Andrology*, 18(3), 343.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M. J., Navarro, J., & Benet, J. (2012). Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human Reproduction*, 27(3), 652–658.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., ... Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernandez-Encinas, A., Amengual, M., Prada, E., Cortés, P., ... Benet, J. (2012). Double-stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS ONE*, 7(9).
- Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., & Yan, J. (2010). Annals of Anatomy Sizing the ends : Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy*, 192(5), 284–291.
- Santana, V. P., Miranda-Furtado, C. L., Pedroso, D. C. C., Eiras, M. C., Vasconcelos, M. A. C., Ramos, E. S., ... dos Reis, R. M. (2019). The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(2), 95–104.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Rios, R., Morales, I., & Castro, A. (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: Relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction*, 21(4), 986–993.
- Tahamtan, S., Tavalae, M., Izadi, T., Barikrow, N., Zakeri, Z., Lockshin, R. A., ... Nasr-Esfahani, M. H. (2019). Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Scientific Reports*, 9(1), 5–11.
- Thilagavathi, J., Venkatesh, S., & Dada, R. (2012). Telomere length in reproduction. *Andrologia*, 45(5), 289–304.
- Tiseo, B. C., Esteves, S. C., & Cocuzza, M. S. (2016). Summary evidence on the effects of varicocele treatment to improve natural fertility in subfertile men. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 239–245.
- Von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 339–344.
- Wang, F., Pan, X., Kalmbach, K., Seth-Smith, M. L., Ye, X., Antunes, D. M., ...
-

Weissman, S. M. (2013). Robust measurement of telomere length in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *110*(21), E1906-12.

WHO. (2010). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. *World Heal Organ Press*, 5th Edition.

Zhang, M., Du, L., Liu, Z., Qi, H., & Chu, Q. (2014). The effects of varicocelelectomy on testicular arterial blood flow: laparoscopic surgery versus microsurgery. *Urology Journal*, *11*(5), 1900–1906.

ANEXO II

Artículo 2

ORIGINAL ARTICLE

Oral antioxidant treatment partly improves integrity of human sperm DNA in infertile grade I varicocele patients

JOSEP GUAL-FRAU¹, CARLOS ABAD¹, MARÍA J. AMENGUAL², NAIM HANNAOUI¹, MIGUEL A. CHECA^{3,4}, JORDI RIBAS-MAYNOU^{5,6}, IRIS LOZANO⁶, ALEXANDROS NIKOLAOU⁶, JORDI BENET⁵, AGUSTÍN GARCÍA-PEIRÓ^{5,6*} & JUAN PRATS^{1*}

¹Servei d'Urologia, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí – UAB, Sabadell, Spain, ²UDIAT, Centre Diagnòstic, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí – UAB, Sabadell, Spain, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Parc de Salut Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴Andrology Laboratory, CIRH, Clínica Corachan, ANACER, Barcelona, Spain, ⁵Departament de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain and ⁶Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (CIMAB), Edifici Eureka, PBM5, Parc de Recerca de la UAB (PRUAB), Campus de la UAB, Bellaterra, Spain

Abstract

Infertile males with varicocele have the highest percentage of sperm cells with damaged DNA, compared to other infertile groups. Antioxidant treatment is known to enhance the integrity of sperm DNA; however, there are no data on the effects in varicocele patients. We thus investigated the potential benefits of antioxidant treatment specifically in grade I varicocele males. Twenty infertile patients with grade I varicocele were given multivitamins (1500 mg L-Carnitine, 60 mg vitamin C, 20 mg coenzyme Q10, 10 mg vitamin E, 200 µg vitamin B9, 1 µg vitamin B12, 10 mg zinc, 50 µg selenium) daily for three months. Semen parameters including total sperm count, concentration, progressive motility, vitality, and morphology were determined before and after treatment. In addition, sperm DNA fragmentation and the amount of highly degraded sperm cells were analyzed by Sperm Chromatin Dispersion. After treatment, patients showed an average relative reduction of 22.1% in sperm DNA fragmentation ($p = 0.02$) and had 31.3% fewer highly degraded sperm cells ($p = 0.07$). Total numbers of sperm cells were increased ($p = 0.04$), but other semen parameters were unaffected. These data suggest that sperm DNA integrity in grade I varicocele patients may be improved by oral antioxidant treatment.

Keywords: Male factor infertility, sperm DNA, varicocele, antioxidants, L-carnitine, sperm, chromatin dispersion

Introduction

Varicocele is a well-recognized cause of decreased testicular function characterized by mild to severe dilation of the internal spermatic vein and the pampiniform venous plexus. This anatomical modification is considered as one of the most common causes of poor sperm production, since it affects semen quality and it interferes with physiological pathways of normal sperm cell ontogenesis (Rodríguez-Rigau et al., 1978; Hauser et al., 2001; Silver et al., 2005). Varicocele affects 4.4–22.6% of the general population. Its prevalence is higher in men with primary infertility (21–41%) and in men with secondary infertility (75–81%) (Saypol et al., 1981; Gorelick & Goldstein, 1993). Varicoceles are classified according to the Dublin grading system: grade III: visible and

palpable at rest; grade II: palpable at rest; and grade I: palpable during the Valsalva maneuver. Subclinical varicoceles are only detectable by Doppler ultrasound (Miyaoaka & Esteves, 2012).

One of the collateral effects of this condition is a production of high amounts of reactive oxygen species (ROS) resulting in oxidative stress, which in turn causes lipid peroxidation of the sperm plasma membrane and nuclear DNA damage (Agarwal et al., 2008; Makker et al., 2009; Aitken & De Iulii, 2010). Sperm cells are particularly vulnerable to oxidative stress, since they contain only limited amounts of ROS-protecting enzymes (Lewis & Simon, 2010). Moreover, patients with varicocele have significantly lower total antioxidant capacity than healthy men (Ramadan et al., 2002; Agarwal et al., 2006; Smith et al., 2006; Pasqualotto et al., 2008). As a

*Shared senior authorship.

Correspondence: Dr. Agustín García-Peiró, Ph.D. Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (CIMAB). Parc de Recerca de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona, España. Tel: + 34 935868728. E-mail: agusti.garcia@uab.es

(Received 7 January 2014; accepted 8 December 2014)

2 *J. Gual-Frau et al.*

result, high levels of sperm cells with fragmented DNA are found in the ejaculate of men with varicocele (Saleh et al., 2003; Chen et al., 2004; Fernandez et al., 2005; Agarwal et al., 2014).

Previous studies characterizing sperm DNA fragmentation (SDF) using the Sperm Chromatin Dispersion test (SCD) revealed two distinctive sperm subpopulations of fragmented spermatozoa: standard fragmented sperm and highly DNA-degraded sperm (DDS) (Fernández et al., 2005; Enciso et al., 2006; García-Peiró et al., 2012). While healthy sperm cells display a large halo of chromatin in the sperm chromatin dispersion (SCD) test, a small or missing halo around a sperm core is associated with fragmented sperm DNA (Figure 1). The DDS subpopulation is recognized by its disorganized core in addition to a missing halo, which reflects massive protein and DNA degradation in these sperm (Gosálvez et al., 2014). Sperm samples from healthy individuals typically contain 1–4% of DDS. In patients with varicocele, however, DDS levels are up to eight times higher than those reported in control samples (Enciso et al., 2006; García-Peiró et al., 2012; Rodríguez et al., 2012).

Antioxidant administration is increasingly used as a potential cure for sperm DNA damage (Greco et al., 2005; Tremellen, 2008; Tunc et al., 2009). A beneficial effect on spermatogenesis after administration of oral antioxidant treatment based on carnitine has previously been reported by our group in a cohort of asthenoteratozoospermia (ATZ)-infertile males without varicocele (Abad et al., 2012). Furthermore, other clinical studies using carnitine report improvement of semen quality of infertile patients with other etiological factors (Vicari & Calogero, 2001; Lenzi et al., 2003; Lenzi et al., 2004; Balercia et al., 2005). The aim of this study was to investigate the potential benefits of treatment with oral antioxidant containing carnitine on general semen parameters and sperm DNA integrity, specifically in grade I varicocele males.

Materials and methods

Study design and patient selection

Twenty infertile men known to have asthenoteratozoospermia and clinical grade I varicocele (WHO, 1999)

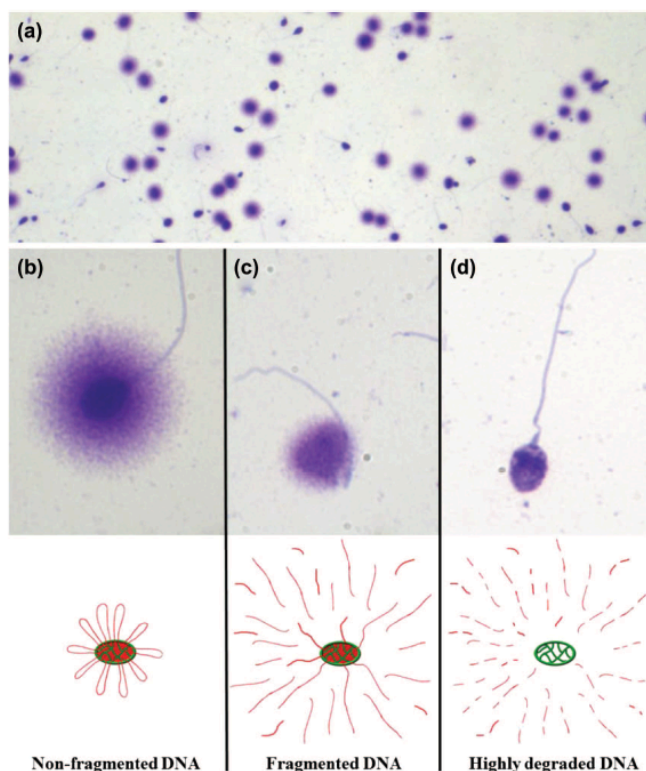


Figure 1. Characteristic types of sperm DNA damage as viewed by the SCD test. (a) Image of a semen sample of a grade I varicocele patient. (b) Sperm showing a large halo of dispersed chromatin, indicative of intact DNA. (c) When sperm DNA presents fragmentation, a number of strands do not remain attached to the cell and will diffuse, which is reflected in the SCD test by a smaller halo from the remaining bound DNA. (d) Sperm with an aberrant core and a missing halo reflect massive protein and DNA depletion, typically seen in highly DNA-degraded sperms (DDS). Here, the DNA fragments diffuse to such an extent that no detectable signal above background can be observed by the SCD test, which is observed as an irregularly stained core.

were selected. Patients with genitourinary inflammation, leukocytospermia, history of autoimmune disease, or altered hormonal profiles were excluded from the study. None of the selected patients had been pre-treated with antioxidants or other medication before the start of the study. Patients who required treatment during the study for other reasons (mainly influenza) were also excluded. In addition, the following exclusion criteria were applied for women: the absence of hormonal imbalance, chromosomal alterations and tubal obstruction, and the absence of bacterial or viral infection.

Semen parameters and sperm DNA fragmentation were determined before and after three months of antioxidant treatment with commercial multivitamins (Androferti, Q Pharma Laboratories; Alicante, Spain) containing L-Carnitine (1500 mg), vitamin C (60 mg), coenzyme Q10 (20 mg), vitamin E (10 mg), vitamin B9 (200 µg), vitamin B12 (1 µg), zinc (10 mg), and selenium (50 µg) per day. Successful pregnancies during treatment and three months thereafter were followed-up. Written informed consent was provided by all patients and the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Sample collection and preparation

Patients provided a semen sample after three days of sexual abstinence, before and after three months of treatment with multivitamins. Fresh ejaculates were allowed to liquefy, and a small amount of sample reserved for the determination of sperm parameters. The remaining sample was mixed at a ratio of 1/1 with test yolk buffer as a cryopreservation medium containing 14% (v/v) glycerol, 30% (v/v) egg yolk, 1.98% (w/v) glucose and 1.72% (w/v) sodium citrate (García-Peiró et al., 2012), aliquoted and incubated overnight at -80°C in an isopropanol bath, and then cryopreserved in liquid nitrogen until the experiment was performed.

Determination of semen parameters

Semen parameters including total sperm count, concentration, motility (progressive types a, b, and a + b), vitality, and morphology were determined according to the guidelines given by the World Health Organization guidelines (WHO, 1999). Sperm Class Analyzer (SCA) software v. 5.1 (Microptic; Barcelona, Spain) was used to determine concentration and motility markers, vitality was assessed by eosin/nigrosin staining, and morphology according to Menkveld et al. (1990).

Assessment of sperm DNA fragmentation

Samples were washed three times in PBS, and sperm concentration adjusted to 10 million per milliliter. Sperm DNA fragmentation (SDF), defined as the percentage ratio of fragmented versus total spermatozoa in the analyzed sample, was assessed using the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (Halosperm Kit, Halotech DNA, S.L.; Madrid, Spain) according to the manufacturer's

instructions. Slides were stained for optical microscopy using Diff-Quick (Panreac; Burlingame, CA), and 400 sperm were scored for each experimental point. The proportion of fragmented sperm cells (SDF) and DNA-degraded sperm (DDS) was determined and expressed as percentages *vs* the total number of sperm analyzed (Enciso et al., 2006; García-Peiró et al., 2011).

Statistical analysis

Data analysis was performed using the software Statistics Package for the Social Sciences, version 15 (SPSS; Chicago, IL, USA). For normal distribution of the variables, the Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilks tests were used. Depending on the presence of asymmetry, values were compared using the Wilcoxon and Sign test for related samples, and the level of significance was established at 95% of the confidence interval (CI).

Results

General semen parameters

Sperm parameters before and after oral antioxidant therapy with multivitamins are given in Table I. Total sperm count was significantly increased by 63.3% relative to pre-treatment values ($p = 0.04$), while other semen parameters remained unaltered.

Sperm DNA integrity

A typical SCD image is shown in Figure 1, and SDF and DDS values are given in Table I. Sperm DNA fragmentation after antioxidant treatment was significantly reduced by 6.73% ($p = 0.02$), which represents a reduction of 22.1% SDF relative to the initial state of the sample. The highly DNA-degraded sperm subpopulation was reduced by 4.25% ($p = 0.07$) after treatment, which represents a relative reduction of 31.3% compared to the initial DDS state.

Pregnancy rate following antioxidant treatment

Out of the twenty infertile couples, two couples participating in this study achieved a pregnancy by natural conception by the end of the treatment.

Discussion

In the present study, sperm quality based on seminal parameters and two markers of sperm DNA integrity (SDF and DDS) were determined in semen samples from a cohort of infertile asthenoteratozoospermic males with clinical grade I varicocele. Varicoceles are characterized by different factors such as reduced testicular blood flow, increased testicular temperature, and a state of chronic inflammation (Hauser et al., 2001). In contrast to fertile and some other infertile groups, considerable levels of DDS are often observed in varicocele patients (Rodríguez et al., 2012). This intense degree

4 J. Gual-Frau et al.

Table I. Summary of key seminal parameters of grade I varicocele patients before and after oral antioxidant treatment.

	Before treatment mean \pm SD; rank	After 3 months of treatment mean \pm SD; rank	P value
SDF (%)	30.38 \pm 13.32 (14.5–42.9)	23.65 \pm 7.5 (14.5–38.5)	0.02*
DDS (%)	13.55 \pm 6.21 (7.5–27.5)	9.3 \pm 2.78 (5.5–13)	0.07
Sperm ml ⁻¹	71.14 \pm 51.2 (12–160)	109.65 \pm 108.77 (22–346)	0.21
Total number of sperm	183.64 \pm 153.54 (28–480)	299.85 \pm 275.45 (90–750)	0.04*
Progressive motility (%)	39.86 \pm 23.37 (9–89)	43.14 \pm 15.59 (18.3–66)	0.55
Viability (%)	53 \pm 21.13 (23–90)	48.19 \pm 13.01 (40–78)	0.48
Normal morphology (%)	2.6 \pm 2.01 (0–6)	3.8 \pm 3.2 (0–10)	0.10

*0.05 Statistical significance threshold.

of DNA damage and nuclear protein depletion is indicative of a defective process of spermiogenesis (Enciso et al., 2006; García-Peiró et al., 2012).

Our group and others have shown that oral antioxidant treatment based on carnitine improves semen quality in different groups of infertile males (Vicari & Calogero, 2001; Lenzi et al., 2003; Lenzi et al., 2004; Balercia et al., 2005; Abad et al., 2012). In addition, low levels of vitamin C are associated with poorer semen quality and more sperm DNA fragmentation (Song et al., 2006). A critical review of 20 clinical studies of antioxidant treatment showed that 19 of these studies report a reduction in oxidative stress (Gharagozloo & Aitken, 2011). We therefore hypothesized that the intake of antioxidants produces a more appropriate testicular environment for sperm production by partial attenuation of ROS. Here, we confirm that antioxidant treatment significantly improved sperm DNA integrity and increased total sperm counts, specifically in infertile asthenoteratozoospermic males with clinical grade I varicocele. Other semen parameters were unaffected and no adverse effects on sperm quality were observed in these patients. Of note, DDS reduction did not reach significance ($p = 0.07$); however, we speculate that more conclusive results could be achieved with a larger patient sample size.

Two couples with a history of repeated failed pregnancies achieved a pregnancy, suggesting that DNA integrity may be an important factor for conception. Numerous studies show an association between sperm DNA damage and unusually long conception times, implantation failures, and an increased risk of miscarriages (Evenson & Wixon, 2006; Zini et al., 2008; Ribas-Maynou et al., 2012). Of significance, poor sperm DNA quality is even linked to severe childhood diseases such as cancer or neurological disorders (Aitken et al., 2009). Since varicoceles have a common incidence in the male population, and high SDF—in particular, high DDS—levels—are encountered in varicocele patients, more attention should clearly be given to sperm DNA quality. DDS can easily be investigated by the Sperm Chromatin Dispersion test, and has the potential to be developed as a diagnostic tool to identify varicocele in infertile males. Further research in this direction is ongoing (Rodríguez et al., 2012; Gosálvez et al., 2014).

In summary, we showed that oral antioxidant treatment augmented the integrity of sperm DNA in patients with grade I varicocele. A modest increase in pregnancy rate by natural conception was also observed. Higher rates of pregnancy loss and childhood diseases are seen after assisted reproductive technology (ART) such as *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection, possibly linked to sperm DNA damage (Basatemur & Sutcliffe, 2008; Zini et al., 2008; Katari et al., 2009). The next step would therefore be to investigate the potential benefits of antioxidant treatment on sperm DNA quality in improving ART success rates.

Acknowledgements

Supported by ISCIII, Ministry of Health, Spain (FIS, PI080623 and PI11/00630), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107), the Ministry of Education and Science, Spain (Grant BFU2010-16738/BFI) and Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (CIMAB).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Abad, C., Amengual, M.J., Gosálvez, J., Coward, K., Hannaoui, N., Benet, J., et al. (2012). Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia*, 45, 211–216.
- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 2–11.
- Agarwal, A., Prabakaran, S., & Allamaneni, S.S. (2006). Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, 630–633.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S.S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World Journal of Men's Health*, 32, 1–17.
- Aitken, R.J. & De Iulius, G.N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 16, 3–13.

Antioxidant treatment in infertile varicocele patients 5

- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., & McLachlan, R.I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, 32, 46–56.
- Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., & Boscaro, M. (2005). Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, 84, 662–671.
- Basatemur, E., & Sutcliffe, A. (2008). Follow-up of children born after ART. *Placenta*, 29, 135–140.
- Chen, C.H., Lee, S.S., Chen, D.C., Chien, H.H., Chen, I.C., Chu, Y.N., et al. (2004). Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Journal of Andrology*, 25, 348–353.
- Enciso, M., Muriel, L., Fernandez, J.L., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M., et al. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *Journal of Andrology*, 27, 106–111.
- Evenson, D.P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65, 979–991.
- Fernandez, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., et al. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84, 833–842.
- García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., et al. (2011). Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertility and Sterility*, 95, 105–109.
- García-Peiró, A., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Abad, C., Amengual, M.J., López-Fernández, C., et al. (2012). Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *Journal of Andrology*, 33, 361–367.
- Gharagozloo, P., & Aitken, R.J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, 26, 1628–1640.
- Gorelick, J.I. & Goldstein, M. (1993). Loss of fertility in men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 59, 613–616.
- Gosálvez, J., Rodríguez-Predreira, M., Mosquera, A., López-Fernández, C., Esteves, S.C., Agarwal, A., & Fernández, J.L. (2014). Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia*, 46, 602–609.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., & Tesarik, J. (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology*, 26, 349–353.
- Hauser, R., Paz, G., Botchan, A., Yorgev, L., & Yavetz, H. (2001). Varicocele: effect on sperm functions. *Human Reproduction Update*, 7, 482–485.
- Katari, S., Turan, N., Bibikova, M., Erinle, O., Chalian, R., Foster, M., et al. (2009). DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Human Molecular Genetics*, 18, 3769–3778.
- Lenzi, A., Lombardo, F., Sgrò, P., Salacone, P., Caponecchia, L., Dondero, F., & Gandini, L. (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and Sterility*, 79, 292–300.
- Lenzi, A., Sgrò, P., Salacone, P., Paoli, D., Gilio, B., Lombardo, F., et al. (2004). A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, 81, 1578–1584.
- Lewis, S.E.M., & Simon, L. (2010). Clinical implications of sperm DNA damage. *Human Fertility*, 13, 201–207.
- Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *The Indian Journal of Medical Research*, 129, 357–367.
- Menkveld, R., Stander, F.S., Kotze, T.Z., Kruger, T.F., van Zyl, J.A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5, 586–592.
- Miyaoka, R., & Esteves, S.C. (2012). A critical appraisal on the role of varicocele in male infertility. *Advances in Urology*, 2012, 597495.
- Pasqualotto, F.F., Sundaram, A., Sharma, R.K., Borges, E.Jr., Pasqualotto, E.B., & Agarwal, A. (2008). Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertility and Sterility*, 89, 602–607.
- Ramadan, L.A., Abd-Allah, A.R., Aly, H.A., & Saad-el-Din, A.A. (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological research*, 46, 363–370.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiro, A., Fernández-Encinas, A., Amengual, M.J., Prada, E., Cortes, P., et al. (2012). Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*, 7, e44679.
- Rodríguez, B., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Martínez-Moya, M., Alonso, C., et al. (2012). Varicocele, leukocytospermia and its impact on the spermatid DNA fragmentation. *Revista Internacional de Andrología*, 10, 3–10.
- Rodríguez-Rigau, L.J., Smith, K.D., & Steinberger, E. (1978). Relationship of varicocele to sperm output and fertility of male partners in infertile couples. *The Journal of Urology*, 120, 691–694.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Said, T.M., Sikka, S.C., & Thomas, A.J.Jr. (2003). Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*, 80, 1431–1436.
- Saypol, D.C., Howards, S.S., Turner, T.T., & Miller, E.D. (1981). Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *The Journal of Clinical Investigation*, 68, 39–45.
- Silver, E.W., Eskenazi, B., Evenson, D.P., Block, G., Young, S., & Wyrobek, A.J. (2005). Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *Journal of Andrology*, 26, 550–556.
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Rios, R., Morales, I., & Castro, A. (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction*, 21, 986–993.
- Song, G.J., Norkus, E.P., & Lewis, V. (2006). Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International Journal of Andrology*, 29, 569–575.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14, 243–258.
- Tunc, O., Thompson, J., & Tremellen, K. (2009). Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 761–768.
- Vicari, E., & Calogero, A.E. (2001). Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis. *Human Reproduction*, 16, 2338–2342.
- WHO: World Health Organization. (1999). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Zini, A., Boman, J.M., Belzile, E., & Ciampi, A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23, 2663–2668.

ANEXO III

Informes del CEIC



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

COLOMA MORENO QUIROGA, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la CORPORACIÓ SANITÀRIA PARC TAULÍ DE SABADELL (Barcelona)

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor Investigador/a para que se realice el estudio titulado: "Estudio de la fragmentación y longitud telomérica del ADN espermático como parámetros de recuperación de la calidad seminal tras varicocelelectomía microquirúrgica en pacientes infértiles con varicocele" Protocolo y Hoja de Información al Paciente v. 1 de Enero de 2015, y considera que:

1. Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsible para el sujeto.
2. La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
3. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudiera derivarse de su participación en el estudio.
4. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
5. Y que el Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell por Gual Fran Josep, como investigador principal.

Lo que firma en Sabadell a martes, 27 enero 2015

Firmado:

Dra. Coloma Moreno Quiroga

Ref.: 2014676



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

COLOMA MORENO QUIROGA, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la CORPORACIÓ SANITÀRIA PARC TAULÍ DE SABADELL (Barcelona)

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor Investigador/a para que se realice el estudio titulado: "Estudio de la fragmentación y longitud telomérica del ADN espermático como parámetros de recuperación de la calidad seminal tras varicocelectomía microquirúrgica en pacientes infértiles con varicocele" Protocolo y Hoja de Información al Paciente v. 1 de Enero de 2015, y considera que:

1. Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsible para el sujeto.
2. La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
3. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudiera derivarse de su participación en el estudio.
4. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
5. Y que el Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell por Gual Frau Josep, como investigador principal.

Lo que firma en Sabadell a martes, 27 enero 2015

Firmado:



Dra. Coloma Moreno Quiroga

Ref.: 2014676

ANEXO IV

Consentimiento del estudio

Título del estudio: Estudio de la fragmentación y longitud telomérica del ADN espermático como parámetros de recuperación de la calidad seminal tras varicocelectomía microquirúrgica en pacientes infértiles con varicocele.

Investigador principal: *Josep Gual Frau, Servicio de Urología. Telf.: 937231010*

Centro: IUCS Parc Taulí. Hospital de Sabadell.

Objetivo/finalidad del estudio

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal pretende profundizar en el conocimiento de calidad seminal en relación con la patología varicocele (varices escrotales). Se le pide que otorgue su consentimiento para que done una muestra de semen.

Se trata de un estudio por el cual se intentará demostrar la utilidad de unos nuevos marcadores que se encuentran en el semen para facilitar una mejor indicación de cirugía en la patología del varicocele, consiguiendo una optimización de recursos y mejorando la calidad de el estudio de los pacientes con alteraciones de la fertilidad con varicocele.

Procedimientos del estudio. Muestra a recoger.

Si usted decide participar, se le solicita que ceda para el proyecto de investigación una muestra de semen obtenida por masturbación.

La muestra se adquirirá de usted dentro del estudio habitual de fertilidad que se realiza dentro del estudio diagnóstico de la patología varicocele. De esa muestra, se cogerá una pequeña parte para analizarla en un laboratorio externo y posteriormente ser destruida. No hay que recoger una muestra añadida, es solamente una pequeña parte de una muestra que ya se recoge en la práctica clínica habitual.

Riesgos/Incomodidades

No existen riesgos o incomodidades en la recogida de la muestra de semen por masturbación

Beneficios

Es posible que de su participación en este estudio usted no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores relacionados con el varicocele podrá beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad y la infertilidad masculina.

¿Qué se hará con su muestra?

Una vez obtenida su muestra, será analizada y posteriormente eliminada.

Los datos serán recogidos de manera codificada como datos disociados.

Los resultados obtenidos del análisis de la muestra estarán disociados de los datos personales y de salud, de manera que únicamente el investigador responsable de este proyecto podrá conocer a quien pertenece la muestra.

Los datos disociados pasarán a ser anónimos una vez finalizado en análisis de resultados del Código del estudio:

Yo, (nombre y apellidos)

1. Declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al paciente y una copia del Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas.
3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un código numérico.
4. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra ésta no se podrá destruir.

YO DOY/NO DOY mi consentimiento para que se pueda realizar el presente estudio con la muestra biológica

Fecha:

Firma del paciente:

YO DOY/NO DOY mi consentimiento para que se guarde mi muestra en una colección registrada por el Investigador Principal del estudio para la realización en el futuro de nuevas pruebas relacionadas con mi enfermedad

Fecha:

Firma del paciente:

YO DOY/NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra en un Biobanco y se puedan realizar futuros estudios relacionados con mi enfermedad

Fecha:

Firma del paciente

YO DOY/NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra en un Biobanco y se puedan realizar futuros estudios relacionados con otras enfermedades.

Fecha:

Firma del paciente:

Expreso mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo del estudio:

YO DESEO/NO DESEO ser informado de los resultados de los estudios. Teléfono o Email de contacto: _____

