



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA "DR. ERNESTO PALACIOS PRÜ"
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

**RELACIÓN ENTRE VARICOCELE, INDICADORES DE
CALIDAD DEL NÚCLEO Y LA MEMBRANA
ESPERMÁTICA CON MARCADORES DE EPIDÍDIMO,
PRÓSTATA Y VESÍCULAS SEMINALES**

Trabajo presentado como requisito parcial para Optar
al Grado de Doctor en Ciencias Médicas Fundamentales

Autor: MSc. Giovanni Vivas Acevedo
Tutora: Dra. María Isabel Camejo Bermúdez

Mérida – Venezuela, Septiembre de 2013

RESUMEN

Relación entre varicocele, indicadores de calidad del núcleo y la membrana espermática con marcadores de epidídimo, próstata y vesículas seminales

Trabajo de Grado para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas Fundamentales. ULA

Autor: MSc. Giovanni Vivas Acevedo

Tutora: Dra. María Isabel Camejo Bermúdez

Objetivos:

1) Evaluar la relación entre de la presencia de varicocele, su localización anatómica, el grado del mismo y la edad de los pacientes con los parámetros seminales. 2) Determinar la relación entre las secreciones de las glándulas sexuales accesorias tales como: fructosa (vesículas seminales), alfa glucosidasa neutra del epidídimo (NAG), fosfatasa ácida prostática (PAP) y la actividad de zinc (próstata) con los parámetros seminales en hombres con y sin varicocele. 3) Determinar la concentración de los oligoelementos selenio y zinc en el semen de los pacientes con varicocele y la relación con los parámetros seminales. 4) Evaluar la asociación entre NAG con la fragmentación del núcleo espermático y la integridad y madurez de la membrana espermática, en pacientes con o sin varicocele.

Materiales y Métodos:

Se obtuvieron muestras de semen de hombres con varicocele (grado I, II y III) y de hombres sin varicocele (normozoospermicos) los cuales fueron usados como grupo control. Las muestras fueron evaluadas por el espermograma, el test hipoosmótico (HOST), selenio (Se), zinc (Zn), fructosa, proteína ácida prostática, enzima alfa glucosidasa neutra (NAG), el test de unión de los espermatozoides al ácido hialurónico (HBA) y se evaluó la fragmentación del ADN mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD).

Resultados: Se encontró que un incremento del grado del varicocele así como de la edad en los hombres con varicocele se asocia con un aumento en el nivel de alteración de la calidad del semen. En relación con la secreciones de las glándulas accesorias sexuales en hombres con varicocele y su relación con los parámetros seminales, se encontró que el varicocele no altera la secreción de fructosa, la proteína ácida prostática ni el zinc, sin

embargo se asocia con una disminución de la actividad de la alfa glucosidasa neutra en el líquido seminal, lo que sugiere disfunción del epidídimo. En cuanto a los niveles de selenio y zinc (componentes de enzimas antioxidantes) se demostró que el Se, pero no el Zn, disminuye en los hombres con varicocele, por otra parte se observó una correlación positiva entre Se y calidad de los parámetros seminales, demostrando la importancia de estos oligoelementos en la función espermática. Por otra parte se encontró que los niveles de NAG, HBA y HOST en plasma seminal estuvieron disminuidos en los pacientes con varicocele en relación al control, mientras que los niveles de fragmentación del ADN fueron superiores en los pacientes con varicocele. Adicionalmente, el estudio de correlación en el grupo total de pacientes evaluados mostró una fuerte correlación negativa entre disminución de los niveles de NAG e incremento de la fragmentación del ADN y una correlación positiva entre NAG y HBA.

Conclusiones: Los hallazgos generales encontrados en esta investigación indican que el varicocele puede ocasionar daños no sólo a nivel del testículo sino también del epidídimo, afectando los parámetros seminales, la secreción de NAG, selenio, la calidad del núcleo y de la membrana espermática, lo que finalmente puede afectar la fertilidad masculina.

Palabras clave: Varicocele, grado y lado anatómico, edad, parámetros seminales, prueba hiposmótica, fructosa, proteína ácida prostática, selenio, zinc, alfa glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico, fragmentación de ADN espermático.

ABSTRACT

Relationship between varicocele, DNA fragmentation, sperm membrane quality and secretions of epididymis, prostate and seminal vesicles

Objectives:

1) To assess the relationship between the presence of varicocele, their anatomical location, the degree of it and age of patients with semen parameters. 2) To determine the relationship between the biochemical markers secreted by the accessory sex glands, such as: fructose (seminal vesicles), epididymal neutral alpha-glucosidase (NAG), prostatic acid phosphatase (PAP) and the activity of zinc (prostate) with the seminal parameters in men with and without varicocele. 3) To determine the concentration of the trace elements selenium and zinc in semen of patients with varicocele and the relationship with semen parameters. 4) To evaluate the association between NAG, sperm DNA fragmentation and integrity and maturity of sperm membrane in patients with and without varicocele.

Materials and Methods:

Semen samples were obtained from men with varicocele (grade I, II and III) and men without varicocele (normozoospermic), which were used as controls. The samples were evaluated by the semen analysis, hypoosmotic swelling test (HOST), selenium (Se), zinc (Zn), fructose, prostatic phosphatase acid, neutral alpha-glucosidase enzyme (NAG), sperm-hyaluronan-binding assay (HBA) and DNA fragmentation assessed by sperm chromatin dispersion test (SCD).

Results:

It was found that an increase of varicocele grade and age in men with varicocele was associated with an increase in the level of impaired semen quality. About the secretion of accessory sex glands in men with varicocele and its relationship with the seminal parameters, we found that the varicocele not alter the secretion of fructose, prostatic acidic protein or zinc, but is associated with decreased NAG activity in seminal fluid, suggesting dysfunction epididymis. About levels of selenium and zinc (antioxidant enzyme components) in seminal plasma of men with varicocele and its relationship with semen parameters, was shown that Se but not Zn, decreases in men with varicocele, moreover,

there was a positive correlation between Se and sperm parameters quality, demonstrating the importance of these trace elements in the spermatic function. Moreover it was found that levels of NAG, HOST and HBA were diminished in seminal plasma of men with varicocele relative to control, whereas DNA fragmentation levels were significantly higher in patients with varicocele. Additionally, studies of correlation in the group of patients evaluated showed a strong negative correlation between decreases of NAG with an increased DNA fragmentation and a positive correlation between NAG and HBA.

Conclusions:

The overall findings in this investigation indicate that the varicocele can cause damage not only in the testis but also in epididymis, affecting seminal quality, the secretion of NAG and selenium, DNA fragmentation and sperm membrane quality, which could affect male fertility.

Key words: Hypoosmotic swelling test (HOST), neutral alpha-glucosidase activity (NAG), prostatic phosphatase acid, semen parameters, sperm-hyaluronan-binding assay (HBA), sperm chromatin dispersion test (SCD), varicocele.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios Todopoderoso pudo culminarse este trabajo para honrar el esfuerzo y la dedicación de varios años.

Es difícil abarcar a quienes han apoyado este trabajo, pero ha sido evidente la solidaridad y el apoyo incondicional de la tutora Dra. María Isabel Camejo, quien fue una sabia maestra en este hermoso trayecto lleno de satisfacciones y también de inmenso dolor en la etapa final.

A la Doctora Judith Velasco, su amada compañera de vida y de academia.

Al equipo del CEDIEG Dres. Ricardo Lozano, Antonio Villavicencio y Adriana Rodríguez; Lcda. Carmen Lozano, Marilú Albarrán, Héctor Picón y Zonia Paredes. Por quienes Giovanni Vivas daba todo sin reserva alguna, en quienes encontró otros hermanos y otro hogar.

Al Dr. José Rafael Luna, Decano de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, sus palabras siempre fueron de gratitud.

A la Dra. María del Carmen Araque, más que autoridad académica, una amistad valiosísima.

A Lourdes Centeno y a su equipo de trabajo que con tanto esmero han brindado el apoyo y la guía para que los sueños y los proyectos se sigan cumpliendo.

A su Familia, en especial a sus Padres Libia y Eloy a quienes amó inmensamente.

A la Ilustre Universidad de Los Andes donde cosechó sus sueños, éxitos y satisfacciones personales y familiares.

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (Código N° FA- 339-05-07-B).

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE

	Página
1-INTRODUCCIÓN	1
2-MARCO TEÓRICO	5
2.1 El varicocele	5
2.2 Espermatogénesis	10
2.3 Tránsito y almacenaje de los espermatozoides en el epidídimo	17
2.4 Formación del semen y marcadores de las glándulas sexuales accesorias	20
2.5 Evaluación seminal: el espermatograma	24
2.6 El núcleo espermático y fragmentación del ADN	28
2.7 Prueba de unión al ácido hialurónico como indicador de la calidad de la membrana espermática	30
3-OBJETIVOS	33
4-CAPÍTULO I	
Efecto del grado de varicocele y la edad sobre los parámetros seminales	
4.1 Introducción	34
4.2 Objetivos	35
4.3 Materiales y Métodos	35
4.4 Resultados	37
4.5 Discusión	43
5- CAPÍTULO II	
Marcadores de las funciones de las glándulas accesorias sexuales en hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales	
5.1 Introducción	47

5.2	Objetivos	47
5.3	Materiales y Métodos	48
5.4	Resultados	50
5.5	Discusión	55
6- CAPÍTULO III		
Selenio y zinc en plasma seminal de hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales		
6.1	Introducción	58
6.2	Objetivos	58
6.3	Materiales y Métodos	58
6.4	Resultados	61
6.5	Discusión	67
7- CAPÍTULO IV		
El varicocele altera los valores de alfa glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico, test hipoosmótico y fragmentación de ADN espermático		
7.1	Introducción	70
7.2	Objetivos	72
7.3	Materiales y Métodos	72
7.4	Resultados	77
7.5	Discusión	82
8-REFERENCIAS		87
9-ANEXOS		
9.1	Autorización	108
9.2	Vivas-Acevedo G, Lozano J.R., Camejo M.I. Efecto del grado y lado del varicocele sobre los parámetros seminales. LIX Convención anual de	109

- ASOVAC. Mérida 15-19 de Noviembre de 2009 (Anexo de Capítulo I)
- 9.3 Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI Effect of varicocele grade and age on seminal parameters. *Urologia Internationalis*. 2010; 85(2):194-9 (Anexo de Capítulo I) 110
- 9.4 Vivas-Acevedo G, Lozano J.R., Camejo M.I. Relación de fructosa y fosfatasa ácida prostática seminal con la calidad del semen en hombres con varicocele. LIX Convención anual de ASOVAC. Mérida 15-19 de Noviembre de 2009. (Anexo de Capítulo II) 111
- 9.5 Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Camejo MI. Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters. *The Canadian Journal of Urology*. 2011; Oct. 18(5):5884-9. (Anexo de Capítulo II) 112
- 9.6 Camejo MI, Abdala L, Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Angeli-Greaves M, Greaves ED. Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Biological Trace Element Research* 2011; Dec. 143(3): 1247-1254. (Capítulo III) 113
- 9.7 Vivas-Acevedo G, Lozano J.R. Camejo M.I. Hyaluronic acid binding by human sperm in patients with varicocele. 20th World Congress on Fertility and Sterility, Munich Sep 12 al 16 de 2010. (Capítulo IV) 114
- 9.8 Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Camejo MI Integridad del núcleo espermático (SCD) y calidad de la membrana por el test de la unión del espermatozoide al ácido hialurónico (HBA) en pacientes con varicocele. XXII Reunión bienal de la asociación latinoamericana de investigadores en Reproducción Humana. 12-14 octubre 2011. Ciudad de Panamá. Panamá (Anexo de Capítulo IV) 117

1-INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un importante problema que afecta aproximadamente al 13-15% de las parejas en el mundo y se define como la incapacidad de la pareja de concebir luego de año de relaciones sexuales regulares sin protección (Jarow y col., 2002). Aproximadamente el 8% de los hombres en edad reproductiva presentan problemas de fertilidad que requiere asistencia médica. Son diversas las causas que pueden conllevar a problemas de fertilidad en el hombre (infecciones genitourinarias, factores inmunológicos, anomalías genéticas, exposición a toxinas gonadotóxicas, desórdenes endocrinos, enfermedades sistémicas y cáncer) y el varicocele por sí solo puede abarcar el 35% del total de esas causas (Madgar y col., 1995; Agarwal y col., 2012), por lo que se considera a esta patología es considerada la principal causa de infertilidad masculina.

Mientras el varicocele tiene una incidencia de 4,4-22,6% en la población general, es de 21-41% en los hombres con infertilidad primaria y de 75-81% en aquellos con infertilidad secundaria (Madgar y col., 1995; Witt y Lipshultz, 1993)., lo que sugiere que el varicocele está relacionado con la fertilidad masculina y que el problema de fertilidad puede agudizarse con el tiempo. El varicocele se asocia con una disminución general en la calidad del semen. Un amplio estudio por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1992), mostró que el varicocele se encontró en el 25% de los hombres con semen anormal, en comparación con el 11% de los hombres con semen normal. Además, el varicocele fue acompañado por una disminución en el volumen testicular, la calidad de los parámetros seminales y disminución de la secreción de células de Leydig, sugiriendo que varicocele está claramente asociada con el deterioro de la función testicular y la infertilidad

A pesar de que el varicocele tiene una alta prevalencia y su impacto sobre la fertilidad ha sido sugerido, son muchas las incógnitas que aún quedan por resolver. Muchas de ellas son en relación a como se origina el varicocele y mediante cuales mecanismos ejerce su efecto fisiopatológico, algunas de ellas se presentarán en el marco teórico. Otras de las controversias surgen en cuanto a los posibles tratamientos que se pueden ofrecer al

hombre con varicocele. Se ha demostrado que algunos hombres con varicocele son fértiles mientras otros no lo son, lo que genera dudas sobre porqué esto sucede. Además dado que el varicocele puede corregirse quirúrgicamente, los médicos se plantean si realmente es necesario para mejorar los parámetros seminales y si es así cuáles pacientes se favorecerían con esta cirugía (edad, parámetros seminales inadecuados, grado del varicocele). Por otra parte se ha demostrado que los pacientes con varicocele presentan altos niveles de estrés oxidativo, entonces entra la discusión sobre la conveniencia o no de tratamientos médicos antioxidantes, los cuales potencialmente podrían mejorar la fertilidad masculina. Para poder encontrar respuestas a estas preguntas se tiene que seguir investigando sobre la fisiopatología del varicocele.

Es por eso que esta tesis de doctorado se dedicó a la investigación de varias de las preguntas que aún quedan por contestar en relación al varicocele. A continuación se muestran los títulos de los capítulos que se presentan en este manuscrito, su justificación y los objetivos que se plantearon alcanzar

Capítulo I: Efecto del grado de varicocele y la edad sobre los parámetros seminales

Se ha sugerido que a mayor grado de varicocele puede aumentar el daño en los parámetros seminales. Por otro lado algunos indican que si el varicocele es bilateral también el impacto sobre la fertilidad sería mayor. Estas opiniones se apoyan en el hecho de la existencia de una mejoría en los parámetros del semen y un incremento en los embarazos asociados con varicocelectomía bilateral. Otro aspecto controvertido es el posible efecto de la edad en los hombres con varicocele (mayor tiempo de exposición al varicocele), porque no todos los pacientes son infértiles en la edad adulta si no reciben tratamiento.

Los objetivos de este capítulo fueron: 1) evaluar el efecto de la presencia de varicocele, localización anatómica y grado, en los parámetros del semen, y 2) identificar las modificaciones relacionadas con la edad en la calidad del semen en hombres con o sin varicocele que asistieron a una clínica de andrología

Capítulo II: Marcadores de las funciones de las glándulas accesorias sexuales en hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales

El varicocele se ha asociado con disminución de la calidad espermática. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de varicocele sobre la función y la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Andò y col., 1990; Roaiah y col., 2007) y la posible relación con la composición de los marcadores bioquímicos del semen y los parámetros seminales.

El propósito de este estudio fue determinar en hombres con varicocele la relación entre los marcadores bioquímicos de la secreción de glándulas sexuales accesorias tales como fructosa (vesículas seminales), alfa glucosidasa neutra del epidídimo (NAG), fosfatasa ácida prostática (PAP) y la actividad de zinc (próstata) y su posible relación con los parámetros seminales

Capítulo III: Selenio y zinc en plasma seminal de hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales

El varicocele se ha asociado con una disminución en los parámetros seminales. El selenio (Se) y el zinc (Zn) son los elementos traza esenciales para la espermatogénesis normal de los mamíferos y juegan un papel crítico en la composición de enzimas del sistema de defensa antioxidante. La deficiencia de selenio y de zinc en el plasma seminal se asocia con mala calidad seminal en hombres fértiles e infértiles. Sin embargo, existe poca información acerca de Se y Zn en el semen de los pacientes con varicocele y su asociación con los parámetros seminales.

El propósito de este estudio fue determinar la concentración de selenio y zinc en el semen de los pacientes con varicocele y la relación con los parámetros seminales.

Capítulo IV: El varicocele altera los valores de alfa glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico, test hipoosmótico y fragmentación de ADN espermático

Aunque la mayoría de los estudios relacionados con varicocele y fertilidad se enfocan principalmente en el daño al testículo, es evidente que dado que el epidídimo es un órgano intraescrotal también puede estar afectado. El epidídimo juega un papel crucial en la maduración espermática, la adquisición de la movilidad progresiva y la capacidad fertilizante (Peña y col., 2001). Es a través del paso de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo donde adquieren la capacidad fértil y la maduración de la membrana plasmática, mediante la modificación de azúcares, proteínas y lípidos (Moore, 1998). Adicionalmente, el núcleo espermático experimenta cambios en la condensación de la cromatina (Golan y col., 1996) con un incremento en los puentes disulfuro en el ADN (Said y col., 1999), lo que confiere mayor estabilidad al material genético

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la relación entre un marcador de la función del epidídimo, con la fragmentación del núcleo espermático y la integridad y madurez de la membrana espermática en pacientes con o sin varicocele y determinar la posible correlación entre funcionalidad del epidídimo, pruebas de calidad de membrana y núcleo con los parámetros seminales.

2-MARCO TEÓRICO

2.1-El varicocele

El varicocele se caracteriza por dilataciones varicosas del plexo pampiniforme del cordón espermático y se observa con mayor frecuencia (90%) en el testículo izquierdo (Naughton y col., 2001; Hendry y col., 1973). Diversos estudios reportan que el varicocele es unilateral en un 70 a 100 % de los casos y bilateral en un 0–23 %. Epidemiológicamente, la incidencia del varicocele en la población general es de aproximadamente 15% y en los hombres que consultan por infertilidad oscila entre el 19% y 41% (Hendry y col., 1973; Cockett y col., 1984). Por otra parte, la presencia de varicocele no es sinónimo de infertilidad, ya que aproximadamente las dos terceras parte de hombres con varicocele son fértiles. Aunque se postula que la infertilidad y las alteraciones en los parámetros seminales se relacionan tanto con el tiempo del varicocele como con la temperatura (Chehval y Purcell, 1992).

Estudios previos indican que la corrección quirúrgica del varicocele mejora los parámetros seminales en un 50% a 80% de los casos (Lome y Ross, 1977; Marks y col., 1986) y la tasa de embarazo entre 31% y 71% (Scott y Young, 1962; Madgar y col., 1995). La incidencia de varicocele en infertilidad secundaria es de aproximadamente 70-80% (Dubin y Amelar, 1977; Gorelick y Goldstein, 1993; Witt y Lipsmltz; 1993), por lo que se ha considerado la presencia de varicocele como causa de la declinación progresiva de la fertilidad. Sin embargo dado que parte de los hombres con varicocele son fértiles no se justifica en todos los casos la varicocelectomía.

Se ha propuesto que la etiología del varicocele es multifactorial, entre los posibles factores que lo pueden causar están: I) Diferencias anatómicas entre la vena espermática derecha y la izquierda. En el testículo derecho la vena espermática tiene su inserción directa en la vena cava inferior mientras que la vena espermática izquierda inserta en la vena renal izquierda. Se cree que la inserción en la vena renal izquierda produce un incremento en la presión hidrostática, la cual es transferida al plexo pampiniforme, causando dilatación y torsión venosa. II) Ausencia de válvulas venosas competentes, originando reflujo sanguíneo

venoso y III) Obstrucción parcial de la vena testicular causada por compresión de la vena renal izquierda, entre la aorta y la arteria mesentérica superior (Naughton y col., 2001). Se ha determinado que la presencia de varicocele puede originar las siguientes condiciones fisiopatológicas, aunque algunas de ellas presentan discrepancia en la literatura.

a) Hipertermia: la relación del incremento de la temperatura intraescrotal, el varicocele y la asociación con los parámetros espermáticos, se ha estudiado desde 1960. La temperatura escrotal es regulada fisiológicamente para que se mantenga inferior a la corporal mediante un sistema de intercambio de calor que se describió por primera vez en 1959 (Dahl y Harrick, 1959). Aún hoy día se sostiene que la temperatura del flujo de sangre arterial espermática es enfriada por el reflujo de la sangre venosa fría del plexo pampiniforme, es decir, que las varicosidades del plexo pueden afectar el efecto de enfriamiento testicular (Mieusset y col., 1987; Nakamura y col., 1987; Nishiyama y col., 1998).

b) Flujo Sanguíneo Testicular: Varios investigadores han demostrado que ocurre un incremento bilateral en el flujo sanguíneo testicular cuando existe varicocele unilateral (Green y col., 1984) y prolongado (Hurt y col., 1986). De esta forma, el varicocele causa daño del sistema de drenaje venoso testicular aumentando la presión hidrostática en la vena espermática izquierda, razón por la cual, el testículo izquierdo es el más afectado. La presión hidrostática se transfiere al plexo pampiniforme y cuando la presión venosa excede la arteriolar en el sistema microcirculatorio testicular, provoca un efecto hipóxico en el tejido testicular. El flujo comienza a estancarse y como consecuencia, la sangre arteriolar oxigenada no fluye adecuadamente al testículo (Chakraborty y col., 1985; Gat y col., 2005a).

Por otra parte, la porción intra-abdominal del drenaje venoso testicular es compleja, con un sistema interconectado de funcionamiento de las venas retroperitoneales, las cuales funcionan como un “bypass” (Kunnen y Comhaire, 1992, Gat y col., 2004). Esta interconexión venosa está asociada con varicocele impalpable con la maniobra de Valsalva, especialmente en el lado derecho. Por consiguiente el varicocele bilateral no se diagnostica en el examen físico, pero se ha observado que las venas palpables e impalpables causan el mismo efecto perjudicial en el testículo, originando en algunos casos oligoteratoastenozoospermia de grado variable (Gat y col., 2004). La infertilidad puede

originarse por la afectación testicular y la oligoteratoastenozoospermia (media, moderada, severa o muy severa) como también azoospermia, la cual podría ser el resultado de una disfunción testicular bilateral (Gat y col., 2005). Al respecto, se ha reportado que independientemente del grado de varicocele en un testículo, el efecto pernicioso ocurre en ambas gónadas (Pasqualotto y col., 2005). La afectación de ambos testículos en el varicocele unilateral podría explicarse por mecanismos hormonales o neuronales (Green y col., 1984, Turner y Lopez, 1990; Turner y col., 1993). Aunque no está claro si la dirección del flujo sanguíneo testicular cambia en asociación con el varicocele, es importante reconocer que un incremento del flujo sanguíneo testicular se correlaciona más con la hipertermia testicular.

c) Presión venosa: la existencia y el mecanismo de los cambios en la presión venosa asociado al varicocele ha sido extensamente debatido. Dicho incremento podría afectar el riego y la microvasculatura testicular, esto se presenta debido a la disminución del mecanismo contra-regulador que se instaura para que se mantenga la homeostasis de la presión intratesticular (Comhaire y Kunnun, 1976; Comhaire y col., 1981).

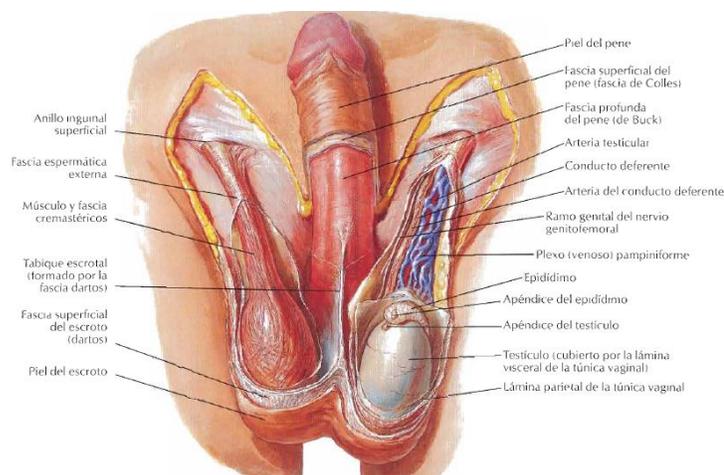
d) Reflujo renal/adrenal: se ha establecido que el 50% de individuos con varicocele presenta flujo retrógrado en la vena espermática izquierda (World Health Organization. Laboratory Manual, 1992), de hecho, la venografía demuestra un incremento del reflujo venoso. En este sentido, la hipótesis que se establece es que el reflujo de productos metabólicos renal/adrenal (por ejemplo catecolaminas) se encuentra en grandes concentraciones en el testículo de individuos con varicocele. La consecuencia inicial es una vasoconstricción testicular crónica, lo que posteriormente puede perjudicar la función testicular (Scholler y col., 1984; Hudson, 1996).

e) Disfunción hormonal: Se ha observado reducción de los niveles séricos de testosterona en hombres infértiles con varicocele lo que ha conducido a la hipótesis de la disfunción de las células de Leydig en estos pacientes, con el consiguiente disminución de la producción de testosterona (Naughton y col., 2001). En este orden de ideas, un estudio multicéntrico realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la influencia del varicocele en los parámetros de fertilidad, demostró que las concentraciones séricas de testosterona en hombres con varicocele con edad superior a 30 años, se encontraban

significativamente disminuidos al compararlos los hombres con varicocele más jóvenes. Este hallazgo supone un detrimento funcional de las células de Leydig dependiente del tiempo de instaurado el varicocele (Sirvent y col., 1990).

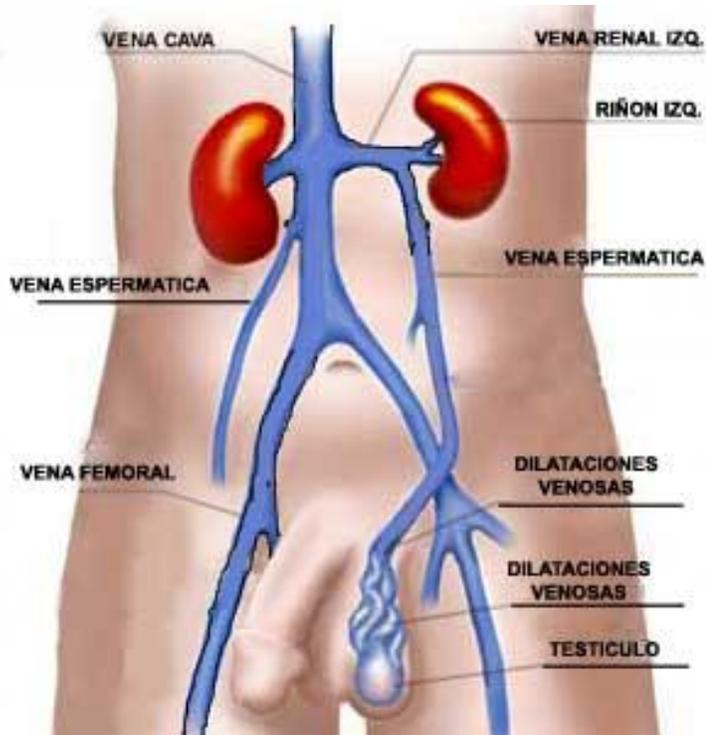
Desde el punto de vista clínico, el grado del varicocele va desde lesiones visibles, palpables hasta varicocele subclínico no palpable (Dubin y Amelar, 1970). La sintomatología con la que cursan los pacientes con varicocele son: dolor en testículo afectado que por lo general se irradia a la región inguinal ipsilateral, sensación de pesadez, así como cambios del volumen y la consistencia en el testículo ipsilateral en el 34% de los pacientes.

En la actualidad se recomienda llevar a cabo la reparación quirúrgica del varicocele de grados II ó III en aquellos casos asociados con una disminución del tamaño testicular ipsilateral. En relación a la corrección quirúrgica, por una parte se reportan grandes beneficios en individuos con grandes lesiones y baja concentración espermática (Steckel y col., 1993), mientras otros reportes indican mejoría cuando la concentración es $<40 \times 10^6/ml$ y con varicocele de larga data. Pero, si la concentración es mayor a dicho valor, con un varicocele subclínico o de poco grado, no se observa mejoría en esta variable (Tinga y col., 1984; Yarboroug y col., 1989; McClure R y col., 1991; Marmar, 2001).



Circulación sanguínea de los testículos y escroto

Fuente: <http://cielomaryciencia.blogspot.com/2011/08/circulacion-arterial-del-escroto-y.html>



Sistema venoso testicular. Varicocele izquierdo

Fuente: <http://www.pediatraldia.cl/varicocele.htm>

Con respecto a la fertilidad, numerosos estudios han sugerido mejoría seminal y tasa de embarazo después de la varicocelectomía (Schlesinger y col., 1994; Pryor y Howards, 1987), en contraposición con resultados negativos reportados por otros investigadores (Nilsson y col, 1979; Baker y col., 1985; Nieschlag y col., 1998; Uehling, 1968; Kursh, 1987). Clínicamente no existen criterios establecidos para la cirugía y solo la infertilidad y/o la baja calidad seminal, conduce a la operación (Marmar y Kim, 1994; Oshinsky y col., 1993; Knudson y col., 1994; de Lamirande y Gagnon, 1992). Sin embargo, los datos sobre el efecto negativo del varicocele sobre los parámetros espermáticos son diversos y aún no son concluyentes. De hecho, el efecto del varicocele sobre los parámetros seminales es motivo de debate (Lopes y col., 1998; Sailer y col., 1995; Irvine y col., 2000).

2.2-Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso cuyo producto final son los espermatozoides, proceso que se inicia desde la vida embrionaria (Clermont, 1972). Las células germinales primordiales migran desde saco vitelino y alantoides a la cresta urogenital (territorio presuntivo de la gónada) y se ubica en la región medular, donde por mitosis dan origen a los gonocitos, los cuales se encuentran en los cordones sexuales, rodeados de células pequeñas de origen local, precursoras de las células de Sertoli (Clermont, 1972). Los gonocitos se multiplican para producir diversas generaciones de espermatogonias, las cuales permanecen en la gónada hasta llegada la pubertad, momento en el cual un grupo de ellas permanecen en calidad de células troncales, en tanto que otras dan origen a espermátocitos primarios, los cuales entran en meiosis y originan finalmente células haploides, las espermátides (Clermont, 1966; Dym y Fawcett, 1971). Estas últimas, luego de un complejo proceso de cito-diferenciación, darán origen a los espermatozoides, los cuales son liberados del epitelio germinal del testículo en el momento de la espermiación, para discurrir por la vía seminal, hasta el epidídimo donde experimentan nuevos cambios morfológicos y funcionales conocidos como maduración espermática (Monesi, 1971).

Detallando el proceso se puede indicar que la espermatogénesis en los mamíferos y en el hombre puede subdividirse en tres fases: prenatal, postnatal y adulta. En todas estas fases hay proliferación y degeneración de células germinales. A su vez en la etapa postnatal se aprecian los cambios morfológicos más relevantes que son a) multiplicación o mitosis espermatogonial; b) maduración o meiosis de los espermátocitos, y c) citodiferenciación, espermiogénesis o espermatoleosis de las espermátides (Monesi, 1971).

1. Fase prenatal:

En el humano, las células germinales primordiales pueden identificarse por su contenido en glucógeno y fosfatasa alcalina, detectadas al final de la tercera semana de gestación (12 somitos) en el saco vitelino, en cercanías del alantoides. Las células germinales primordiales migran a la cresta urogenital y tanto los gonocitos derivados de ellas por mitosis como las células del epitelio celómico forman los cordones sexuales. Se han distinguido dos tipos de gonocitos en el humano. Hasta la 6^o semana de embarazo se

observa un tipo indiferenciado, mientras que a la 10ª semana se observa un tipo de gonocito más diferenciado y rico en glucógeno. Cerca del tercer mes de gestación, además de los gonocitos se encuentran las “espermatogonias fetales”, que no contienen glicógeno, en las cuales la ultraestructura mitocondrial es característica, escasa matriz, formas redondeadas y menor número de crestas. Algunas de estas espermatogonias degeneran. No se sabe si las espermatogonias “prepuberales” y las del adulto, en el hombre derivan de los gonocitos o de las espermatogonias fetales o de ambos (Baserga, 1986; Bustos-Obregon y col., 1975).

2. Fase postnatal:

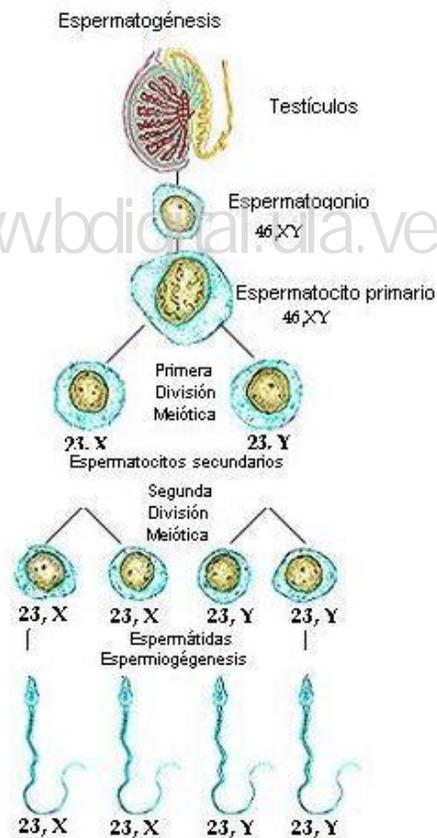
Luego del nacimiento un gran número de células germinales degeneran. Las células remanentes proliferan, siendo su morfología y comportamiento poco conocidos. En 1970 Vilar describió dos tipos de espermatogonias en el niño. Al parecer entre 3 1/2 meses a 13 años de edad, hay dos tipos de espermatogonias semejantes a los tipos Ap (pálida) y Ad (oscura) que se han descrito en el adulto. Según este estudio, el tipo Ap es más frecuente hasta los 13 años, observándose espermatogonias fetales hasta los 4 años junto a un tipo transicional. Las espermatogonias tipo B y espermatocitos se observaron por primera vez en niños de 4 años de edad (Arrau y col., 1981).

3. Fase adulta:

En la etapa adulta se desarrollan tres fases que son espermatogénesis, meiosis de los espermatocitos y espermiogénesis.

Durante la espermatogénesis hay una notable expansión de las espermatogonias (Clermont, 1972). Inicialmente, se consideró que las espermatogonias Ap constituían las células troncales, pero posteriormente se ha planteado que tanto las Ap como Ad pueden actuar como células madres para la expansión de espermatogonias (Vergouwen y col. 1991). Se ha considerado que las Ap son constantemente activas y que las Ad son las que se diferencian a Ap para seguir el proceso de expansión “solamente” cuando hay pérdida celular severa. En esta fase hay perpetuación de las células espermatogoniales (Ap y Ad) a través de divisiones mitóticas originándose las B y a partir de éstas se diferencian los espermatocitos primarios (Arrau y col., 1981).

Cuando se inicia la pubertad continúa la espermatogénesis, así las espermatogónias se dividen por mitosis y dan origen a los espermatozoides primarios. Cada espermatozoides primario sufre una primera división por meiosis (meiosis I) y genera dos espermatozoides secundarios haploides, es decir, con la mitad de la dotación cromosómica de la especie. A su vez, estos pasan por la meiosis II y producen cuatro células haploides llamadas espermátidas. Finalmente, las espermátidas presentan cambios significativos en su morfología que serán descritos más adelante. La espermátide termina por transformarse en espermatozoide, pero su maduración está determinada por su tránsito a través del epidídimo (Mieusset y Bujan, 1995). Junto a las células de Sertoli, se desarrollan varias generaciones de células germinales en el túbulo seminífero (Nelson, 1950).



Esquema de la espermatogénesis

Fuente: <http://vaaleew6.blogspot.com/2010/09/erhg3423g45654.html>

En el túbulo seminífero la cohorte de células más jóvenes se encuentra sobre la membrana basal y las células más diferenciadas se encuentran más próximas al lumen, observándose ocasionalmente los espermatozoides secundarios. El patrón de crecimiento se expresa en un ciclo en forma de ondas con diferentes asociaciones celulares llamadas etapas. De una a dos generaciones de células tienden a mantenerse agrupadas, y esas células agrupadas se mantienen intactas a lo largo de los ciclos sucesivos. De manera que una sola sección transversal del túbulo, no siempre revela todas las generaciones de la espermatogénesis (Yurchenco y Schittny, 1990).

La transformación de la espermátide (célula redonda y haploide) en espermatozoide (célula flagelada) se conoce como espermiogénesis. Se han descrito varias fases en este proceso:

a.- Fase de Golgi: En esta fase, los gránulos proacrosómicos (gránulos PAS +) se hacen visibles en la zona de Golgi. Ellos se unen hasta formar un gránulo mayor, rodeado de una vesícula grande, que se adhiere a la membrana nuclear en lo que será el polo anterior del núcleo del espermio. En el polo opuesto, uno de los dos centriolos da origen al flagelo.

b.- Fase de Capuchón: La vesícula acrosómica se aplasta y expande sobre la superficie del núcleo; se visualizan dos zonas, gránulo y casquete, ambas rodeadas por una membrana derivada de la vesícula de la zona de Golgi. Los centriolos migran, de modo que el centriolo principal queda situado en el polo posterior del núcleo. El distal es el corpúsculo basal del flagelo. Este se ha alargado y adquiere la ultraestructura típica con dos túbulos centrales y nueve pares de elementos periféricos, ordenados circularmente (de Kretser, 1987).

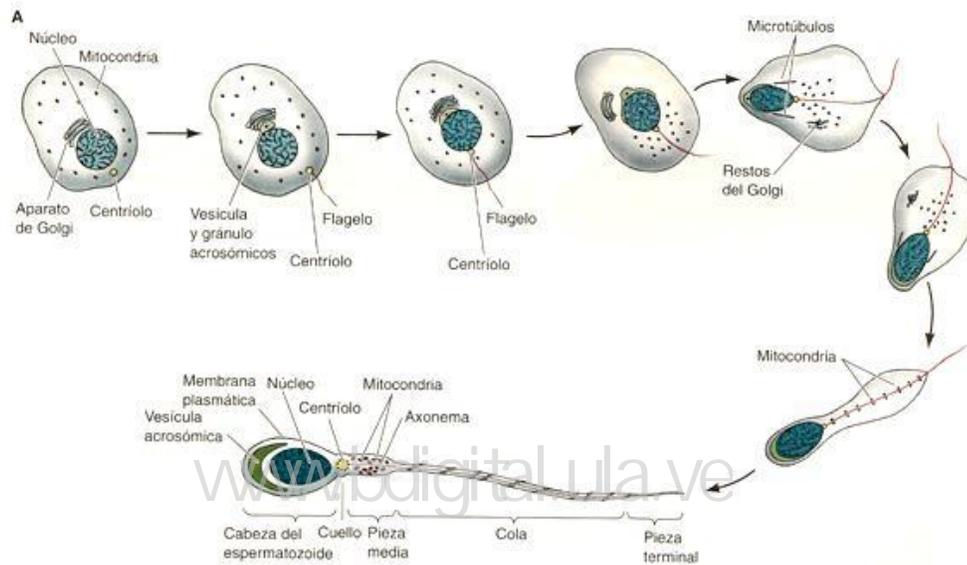
c.- Fase Acrosómica: Caracterizada por transformaciones del acrosoma, del núcleo y del flagelo. El núcleo se hace excéntrico, se alarga y deforma, y la cromatina se condensa. El acrosoma se adapta a la forma del núcleo y comienza a adquirir la forma que es específica para el espermatozoide de cada especie. El citoplasma, con sus organelos residuales, se desplaza caudalmente a lo largo del flagelo. En el citoplasma se hace evidente un cuerpo denso, el cuerpo cromatoide, que se aproxima al centriolo distal y forma un anillo en torno al flagelo. Las mitocondrias, que se encontraban marginadas en el citoplasma

periférico, migran disponiéndose alrededor del flagelo y constituyen posteriormente la vaina o hélice mitocondrial del segmento medio del espermatozoide. En la región caudal del núcleo se organizan microtúbulos citoplasmáticos que envuelven la primera porción del flagelo y parte del núcleo y constituyen la estructura denominada “manchette” (Holstein, 1970).

d.- Fase de Maduración: En este periodo se contempla la transformación a espermatozoide. La cromatina se condensa hasta obtener un aspecto paracrystalino, y el acrosoma (también condensado) adquiere la forma propia de la especie (Holstein, 1970). Las regiones de la cola del espermatozoide se diferencian mejor. Nueve gruesas fibras periféricas rodean la estructura axial del flagelo casi hasta su extremo caudal. Se diferencia la pieza de conexión (cuello) con la cabeza y se estructura el segmento medio con su vaina de mitocondrias. La porción distal del flagelo (o futuro segmento principal) se rodea de una vaina fibrosa, que no existe en el segmento terminal, en el que solo la membrana plasmática rodea el componente axial del flagelo. El exceso de citoplasma, que pende como un apéndice de la espermátida madura, se elimina en el lumen del túbulo (cuerpo residual de Regaud) o es fagocitado por las células de Sertoli. Una pequeña porción (gota citoplasmática) puede quedar adherida a la espermátida y va a ser eliminada durante la maduración, en la vía espermática. El cuerpo residual contiene restos de organelos celulares, ribosomas y lípidos, poco después de su liberación, las espermátidas maduras se desprenden al lumen durante la espermiación (Colpi, 1994).

Una vez que están formados los espermatozoides ellos son liberados a la luz de los túbulos seminíferos en el fenómeno que se conoce como espermiación. En mamíferos puede ocurrir, según la especie, en forma espontánea o inducida por el coito. Por ejemplo, en el Hámster, la espermiación espontánea ocurre en estado VIII del ciclo, en el cual las espermátides maduras están incluidas en el citoplasma de las células de Sertoli, con su cuerpo residual conectado en la región del cuello por un tallo fino (Sharpe, 1983). El citoplasma apical de Sertoli es rico en retículo endoplasmático liso, cuyas cavidades se dilatan, se hidrata la matriz del citoplasma y se borran las cavidades sertolianas que alojan a las espermátidas de modo que estas son expulsadas al lumen. En la rata el proceso es similar, con la diferencia de que la mayoría de los cuerpos residuales son fagocitados por

las células de Sertoli. Esta observación ha permitido a algunos autores sugerir que los lípidos presentes en estos cuerpos serían la señal química que permite a la célula de Sertoli regular el carácter cíclico del proceso de espermatogénesis. La espermiación es inducida por acción de la Hormona Luteinizante (Parvinen, 1982).

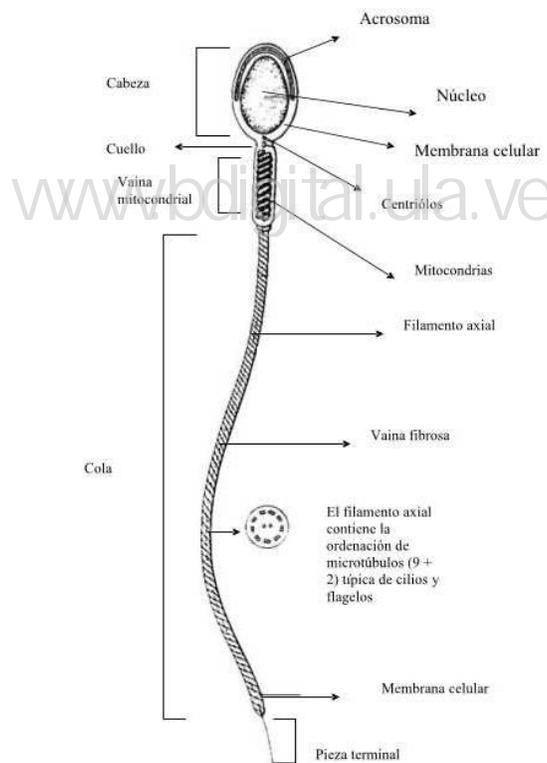


Representación del proceso de espermiogénesis

Fuente: http://www.google.com.ec/imgres?q=espermiogenesis&num=10&hl=es&gbv=2&biw=1280&bih=643&bm=isch&tbnid=ISh_9YpiaIu9NM:&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espermiog%25C3%25A9nesis.jpg&docid=rv4rECuLJ2mIDM&imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/Espermiog%2525C3%2525A9nesis.jpg&w=593&h=345&ei=nATLtsTPEsja0QGgs6AL&zoom=1

El producto final de la espermatogénesis los espermatozoides maduros constan de tres partes: cabeza, cuello y flagelo o cola. La cabeza: mide 4,5 μm de largo y 2,5-3,5 μm de ancho. Está constituida fundamentalmente, por el núcleo, cuya cantidad de ADN corresponde a la de un núcleo haploide, la cromatina se presenta muy compacta, de estructura paracrística, y contiene ADN y proteínas básicas ricas en arginina (Fawcett,

1970). El acrosoma recubre la porción anterior del núcleo, en forma de una vesícula que contiene el gránulo acrosómico o sus derivados. Su forma y extensión es variable según la especie. El acrosoma está formado por lipoglicoproteínas y contiene en su cavidad enzimas, tales como hialuronidasa y acrosina (enzima tripsina-símil); en tanto que siendo un agente lítico, la zona lisina, parece estar unida a la membrana acrosómica interna (Fawcett, 1970). La región del cuello es variable y poco definida en el espermatozoide humano, en la cual hay una zona articular que conecta la cabeza con el flagelo. El flagelo está compuesto por el segmento medio, principal y terminal. El filamento axial responde al patrón estructural (9+2) propio de cilios y flagelos, aunque en muchas especies, nueve estructuras proteicas gruesas rodean a este complejo en el segmento medio. Por fuera se dispone una vaina de mitocondrias, a veces modificadas.



Esquema de un espermatozoide

(Fuente: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1495>)

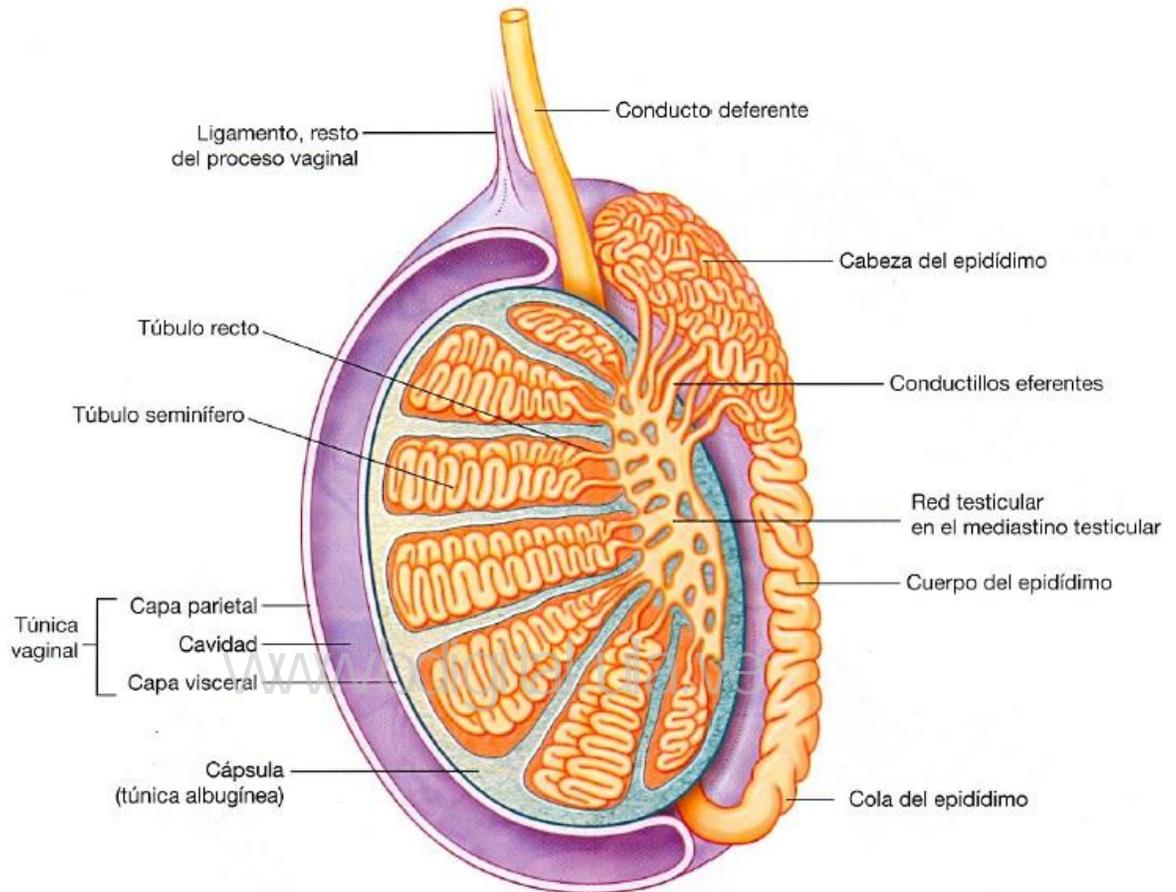
Entre las enzimas respiratorias mitocondriales, la lactato-dehidrogenasa muestra una isoenzima (LDH-X o LDH-IV) propia de las células germinales, ya que no se encuentra en tejido somático (Eliasson y Virji, 1985). El espermatozoide eyaculado efectúa tanto respiración como glicólisis. La energía liberada se utiliza en el movimiento del espermatozoide. En el flagelo hay una ATPasa. Además se han aislado proteínas similares a la miosina, por lo que se supone que la química y mecánica de la contracción del flagelo se parece a lo descrito para el músculo estriado. En la pieza principal hay un complejo proteico en forma de dos gruesas “costillas” (ribs) longitudinales que rodean el complejo axial, rodeadas a su vez por una vaina fibrosa o hélice proteica. El segmento terminal o desnudo muestra solo el complejo axial recubierto por la membrana plasmática (Fawcett, 1970).

2.3-Tránsito y almacenaje de los espermatozoides en el epidídimo

Mientras permanecen en los testículos los espermatozoides se encuentran inmóviles e infértiles, y sólo después de entrar en el ducto epididimario, experimentan una serie de cambios que les permite adquirir la capacidad de movilidad progresiva y de fertilidad. Los espermatozoides una vez culminada su estructuración abandonan el testículo y pasan al epidídimo por los llamados túbulos seminíferos. Estos túbulos ocupan los lobulillos o compartimentos dentro del testículo que están limitados por los tabiques de tejido conjuntivo que se extiende hacia dentro desde la túnica albugínea. Los diferentes túbulos de cada lobulillo forman asas retorcidas, cuyos extremos convergen hacia la región posterior, constituida por tejido conjuntivo muy vascularizado, que recibe el nombre de mediastino testicular. Dentro de esta estructura, existe un plexo laberíntico de canales revestidos de epitelio que se denomina Rete Testis (Fawcett, 1991).

La palabra epidídimo viene del griego que significa adyacente al testículo, está constituido por un tubo extremadamente largo y contorneado, cuya longitud en el hombre 3-4 metros. Anatómicamente consta de tres segmentos, cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda). La parte inicial y media es donde se maduran los espermatozoides y la parte

final o terminal es la región de almacén de los espermatozoides maduros para ser eyaculados (Court, 1984).



Representación esquemática del testículo y el epidídimo

Fuente: <http://luisperezsqutesa.blogspot.com/2012/04/anatomia-del-sistema-reproductor.html>

En el epidídimo los espermatozoides experimentan la maduración epididimal (Orgebin-Crist, 1981). La maduración se define como un proceso complejo que confiere al espermatozoide su capacidad funcional, movilidad y poder fertilizante, sin la cual no es capaz de fecundar al ovocito. El espermatozoide que se encuentra en el testículo de los mamíferos no es capaz de fertilizar al óvulo, mientras que si es fértil luego de su paso y

almacenaje por el epidídimo. El sitio exacto del epidídimo en donde los espermatozoides empiezan a adquirir su capacidad fertilizante varía de una especie a otra. En algunas especies (verraco), es en el segmento distal de la cabeza, mientras que en otros (rata), es en la parte distal del cuerpo del epidídimo (Court, 1984). En general se considera que en la cabeza y cuerpo se lleva a cabo la maduración y la cola funciona como depósito. Tampoco todos los espermatozoides adquieren su capacidad fertilizadora simultáneamente. Algunos aparentemente están fértiles mucho más rápido o en la región más proximal del epidídimo que otros. Sin embargo, como regla general, no es sino hasta que entra a la cola del mismo, en donde la gran mayoría de los espermatozoides tienen su potencial fertilizante completo (Yanagimachi, 1988). Se cree que el AMP cíclico y AMP dependiente de proteína Cinasas están involucradas en la regulación esencial de las funciones del espermatozoide como son: movilidad, maduración epididimal, capacitación y reacción acrosomal (Oyen y col., 1990).

Durante su paso por el epidídimo los espermatozoides adquieren moléculas como glicoproteínas específicas, sustancias orgánicas, glicerilfosforilcolina y carnitina y remueven otras, modificándose así la composición de la membrana espermática (Yanagimachi, 1988, Eddy y col., 1985). Adicionalmente se incrementan los puentes de disulfuro SH a S-S del núcleo espermático confiriéndole mayor estabilidad al ADN nuclear (Bedford y Calvin, 1974). Uno de los cambios más prominentes en el espermatozoide durante su paso por el epidídimo, es la habilidad a adquirir su movimiento progresivo, sirviéndole la cola del mismo como locomoción. El espermatozoide testicular no tiene movilidad o su movilidad es muy débil. Esto es cierto no solo dentro del testículo sino cuando estos son suspendidos en solución salina fisiológica. Espermatozoides maduros obtenidos de la cola, inician su actividad con movimientos progresivos al ponerlos en la solución salina fisiológica, mientras que los de cabeza tendrán movimientos lentos y solamente de la parte distal de la cola del espermatozoide dando movimientos sin sentido o circulares (Monhi y Yanagimachi, 1980).

Se requiere de determinado tiempo para que el espermatozoide pase a través del epidídimo y madure; este tiempo se puede medir marcando el ADN de las células germinales con timidina ^{32}P o H3 para seguir así la progresión del espermatozoide marcado a través del epidídimo por autorradiografía o bien midiendo la radioactividad. La

duración del tránsito de cada segmento está dada por la diferencia entre la llegada del primer espermatozoide marcado en la cabeza y su presencia en cada segmento (cabeza, cuerpo y cola), mientras la duración del tránsito es proporcional al tamaño de la reserva en cada segmento (Orgebin-Crist, 1981). Finalmente, se puede también calcular dividiendo el número de espermatozoides dentro de cada segmento por producción espermática diaria del testículo que provee estos espermatozoides (Turner y col., 1990). Aunque el largo del ducto epididimario es variable dependiendo de cada especie pero, el tiempo de tránsito es muy parecido, aproximadamente de 10 a 12 días.

Bajas concentraciones de marcadores de epidídimo han sido asociados a bajo volumen testicular posiblemente por la reducción del flujo sanguíneo (Casano y col., 1987), reducción de los andrógenos circulantes (Lewin y col. 1981) o al tamaño de la glándula (Cooper, 1986). Las concentraciones circulantes testosterona están asociadas con la secreción epididimaria y con el porcentaje de espermatozoides móviles, lo que sugiere que los marcadores epididimarios reflejan un aspecto importante de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Cooper y col., 1988).

www.bdigital.ula.ve

2.4- Formación del semen y marcadores de las glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias están conformados por la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales o de Cowper, las ricas secreciones de estas glándulas constituyen el 90% del volumen y composición química del plasma seminal; los líquidos provenientes de otras partes del tracto reproductor masculino, como los testículos y el epidídimo, constituyen menos del 10% del volumen total del semen.

En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo donde están almacenados los espermatozoides, es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, hasta la uretra prostática. A esta altura se añade la secreción prostática. Luego, en un segundo tiempo, al contraerse las vesículas seminales, se descarga su secreción en los conductos eyaculadores. Del volumen total del semen menos del 10% representa secreciones del testículo y epidídimo, 15-30% es de secreción prostática y el 40-60% la secreción de las vesículas seminales.

El plasma seminal es un medio rico y complejo. Sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo y protector de los espermatozoides . (Poirot y Cherruau, 2005). Está compuesto de:

- Minerales: (Na + , K + , Cl - , Ca ++, Mg ++ , Zn ++);

-Glúcidos: glucosa (0,39 mmol/L) fructosa (de 5,5 a 27,5 mmol/L fuente de energía para los espermatozoides);

-Ácidos orgánicos: ácido cítrico que contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del esperma; ácido ascórbico protector de los espermatozoides de los radicales libres.

-Lípidos: colesterol; glicerofosforilcolina.

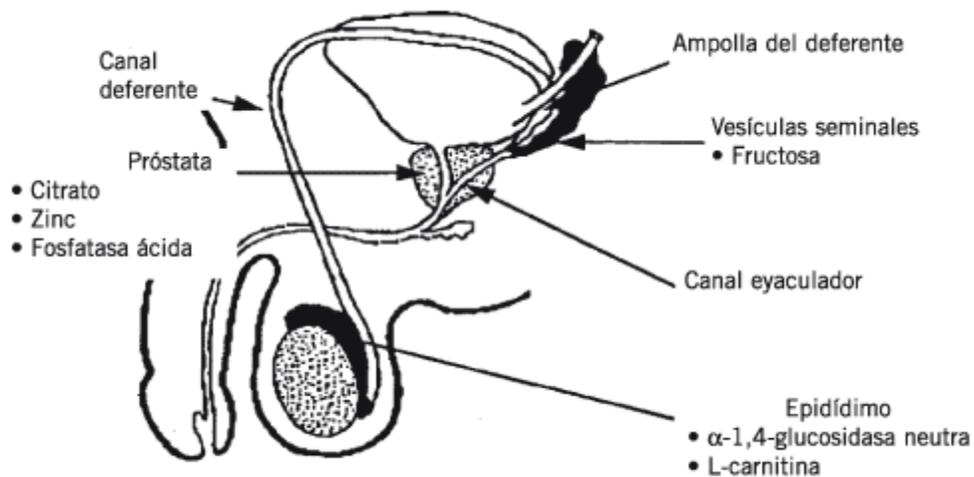
-Esteroides: testosterona; androsterona, androtenediona.

-Constituyentes de bajo peso molecular: aminoácidos; carnitina: papel importante en el metabolismo de los espermatozoides bajo la forma de acetilcarnitina; espermidina; espermina: es responsable del olor del esperma (oxidación) y es utilizada en medicina legal para identificar rastros de esperma (cristales de Charcot); glutatión: protector de los espermatozoides por su poder reductor)

-Proteínas: concentración inferior a la del suero sanguíneo con un perfil electroforético que muestra un reparto muy diferente de las fracciones: albúmina = 6,3%; α globulina = 15,9%; β globulina = 41,1%; γ globulina = 23,2%; fracciones que no migran = 13,5% (Ejemplo de proteínas importantes: Receptor de andrógenos, transportador de andrógenos).

-Más de 50 actividades enzimáticas: hidrolasas (fosfatasa ácida, α 1, α 4 glucosidasas), deshidrogenasas;

-Prostaglandinas



Marcadores bioquímicos de las glándulas sexuales accesorias

Fuente: Poirot C., Cherruau B. Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. Acta bioquím. clín. latinoam. [revista en la Internet]. 2005 Jun [citado 2013 Abr 07]; 39(2): 225-241. Disponible en:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200010&lng=es

Para conocer el funcionamiento de cada una de las glándulas accesorias se han identificado moléculas o marcadores característicos de cada una, los cuales se pueden medir en el laboratorio a partir del plasma seminal. Los marcadores más utilizados para cada una de las glándulas sexuales accesorias se describen a continuación.

Marcadores del epidídimo:

-L-carnitina: La carnitina está en dos formas en el espermatozoide: L-carnitina y acetilcarnitina. Desempeña un papel en la adquisición de la movilidad progresiva, es un transportador de ácidos grasos. Es el marcador del cuerpo y la cola del epidídimo, pero no es secretada por las células de la cabeza. Existe una pequeña secreción extraepididimaria del orden del 15 al 20%.

- α -1,4-glucosidasa neutra: La α -1,4 glucosidasa es un hidrolasa que está en dos formas en el espermatozoide: una forma ácida de origen prostático y una neutra de origen

epididimaria. En el epidídimo desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides.

Marcador de las vesículas seminales:

-La fructosa: es el marcador más específico segregado en ellas. Es sintetizada por las células epiteliales a partir de la glucosa sanguínea. Es la fuente de energía de los espermatozoides. Su secreción es andrógeno dependiente.

Marcadores de la próstata

-Citrato: El citrato es el anión principal. Desempeña un papel quelante de cationes. Existe una estrecha correlación entre las concentraciones de zinc y citrato.

-Zinc: El zinc es un catión específico del plasma seminal dotado de poder bactericida. Su papel sería estabilizar la condensación de la cromatina. Es transportado por el citrato y las proteínas.

-Fosfatasa ácida prostática: Es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos. La isoenzima hallada en el semen es específica de la próstata (Poirot y Cherruau, 2005).

2.5-Evaluación seminal: el espermograma

El análisis del semen es la prueba utilizada en la clínica andrológica para valorar la fertilidad masculina. En ella se evalúa la calidad seminal pero no la interacción con el gameto femenino, por ese motivo un espermograma dentro de los valores normales indica que el hombre tiene una calidad seminal adecuada, pero no puede garantizar la fertilidad masculina.

Desde hace varias décadas una serie de manuales se han redactado para tratar de estandarizar las condiciones de análisis del semen a nivel mundial. Los valores de referencia han cambiado a lo largo del tiempo, lo que se aprecia al comparar los manuales de la OMS en sus versiones, primera edición (1982), segunda edición (1987), tercera edición (1992), cuarta edición (1999) y por último la quinta edición, referida como OMS 2010 (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition).

Un análisis de semen comienza con la recolección de la muestra por masturbación y con una abstinencia sexual de 2-7 días. Se debe transportar al laboratorio antes de cumplirse 60 min. desde la recolección. Una vez en el laboratorio se le realizará la evaluación macroscópica y microscópica. El examen macroscópico debe ser hecho mediante inspección simple inmediatamente después de la liquefacción, donde se evalúa la consistencia, el color, el volumen y el pH. El pH del semen refleja el balance entre diferentes valores de pH de diferentes secreciones de las glándulas accesorias, alcalino de las vesículas seminales y ácidas de la próstata. La evaluación microscópica incluye:

1- Contaje espermático en cámaras de recuento celular (Neubauer o en cámara Makler)

2-Movilidad espermática: La movilidad debe ser determinada tan pronto como sea posible después de licuada la muestra, la movilidad se clasifica en Movilidad Progresiva: aquellos espermatozoides se mueven activamente, ya sea de manera lineal o en un gran círculo, independiente de la velocidad; Movilidad No Progresiva: incluye todos los patrones de movilidad pero con ausencia de progresión como el avance en pequeños círculos; Inmóviles: aquellos espermatozoides sin movimiento.

3-Morfología espermática: Otro parámetro evaluado en el espermograma es la morfología espermática. Las primeras observaciones morfológicas comienzan con Leeuwenhoek en 1680. En tiempos modernos MacLeod (1951) establece una relación entre proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado e infertilidad masculina. Estudios realizados por Fredricson y Bjork (1977) con coloraciones vitales demuestran que los espermatozoides morfológicamente anormales tienen menos probabilidades de estar vivos que aquellos de formas normales. Los mismos autores observaron que el transporte espermático a nivel cervical estaba influenciado por la morfología espermática. Con la incorporación de la videomicrografía Overstreet y col., (1982) demostraron que los espermatozoides anormales tienen más probabilidad de estar inmóviles

Para determinar cuáles espermatozoides son los que poseen la mayor posibilidad de fecundar al óvulo se recuperaron espermatozoides del tracto reproductor femenino en el moco endocervical post-coital y también de la superficie de la zona pelúcida y se determinó la morfología de esos espermatozoides (Fredricsson & Björk, 1977; Menkveld y col., 1990; Menkveld y col., 1991, , Menkveld, 2013). Los espermatozoides normales tendrían más probabilidades de migrar por el tracto reproductor femenino, atravesar las capas del ovocito, unirse a la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito.

La morfología espermática es el reflejo principal de la espermatogénesis, por lo que puede ser considerada como un buen marcador de la función testicular. En 1987, Kruger y col, encuentran una relación entre la morfología espermática y la tasa de fertilización en la Fertilización In Vitro. De acuerdo a estos resultados describe tres patrones:

- Normal \geq 14% formas normales con buena tasa de fertilización
- Buen pronóstico 4 a 14% formas normales con una tasa de fertilización regular.
- Mal pronóstico $<$ 4% formas normales con una tasa de fertilización muy disminuida.

Numerosos trabajos demostraron la influencia de la morfología espermática en los resultados de Fertilización In Vitro, (Molina y col. 1995). En el mismo estudio observamos

que cuando la morfología era inferior al 4% no se obtuvieron embarazos (Molina y col. 1998)

Tabla. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95%

	1999, 4 ^{ta} edición ³	2010, 5 ^{ta} edición ⁴
	Valor de referencia	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 ⁶ /mL	15 x 10 ⁶ /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 ⁶	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /mL	< 1 x 10 ⁶ /mL
Mar test	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas
"Immunobeads"	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas

Fuente: Sarabia y Munuce (2010)

4-Viabilidad:

Se expresa en porcentaje de espermatozoides vivos. Se hace con la ayuda de una coloración vital. Se basa en el hecho de que el colorante penetra las células muertas y no penetra las células vivas. Para los espermatozoides, la tinción más utilizada es la asociación eosina-nigrosina. Los espermatozoides rosados son los muertos, los vivos permanecen

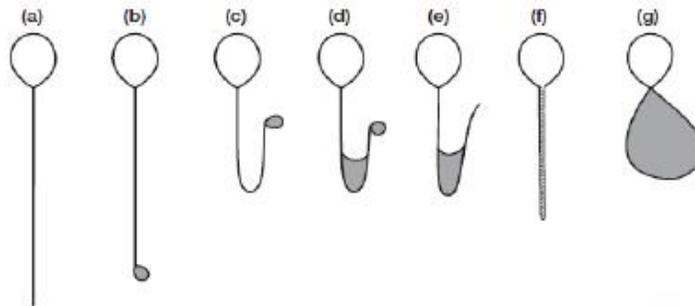
blancos. Una disminución de la vitalidad, necrospemia, se encuentra en las infecciones espermáticas o en las causas tóxicas.

5-Otras células en el semen: El eyaculado además de poseer espermatozoides, posee otros elementos y células que pueden tener importancia clínica. Esto incluye células epiteliales del tracto genitourinario, leucocitos y células inmaduras de la espermatogénesis. Estas células llamadas en general “células redondas”

6- Test hipoosmótico (HOST): Un examen complementario que se puede realizar para evaluar la viabilidad espermática y la calidad de la membrana espermática es el test hipoosmótico (HOST). La evaluación de la integridad de membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad masculina. Además, esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, y por ende para la fertilidad del macho. El test hipoosmótico (HOST) fue desarrollado para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática y se recomienda como indicador adicional de fertilidad por ser económico y de fácil manejo. El test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Jeyendran y col. 1984, Correa y Zavos, 1994). El reciente manual de evaluación del semen (WHO, 210), indica que un 58% de espermatozoides hinchados es el valor inferior normal de viabilidad y espermatozoides con membranas intactas.

Fig. 2.6 Schematic representation of typical morphological changes in human spermatozoa subjected to hypo-osmotic stress

(a) no change. (b)–(g) various types of tail changes. Swelling in tail is indicated by the grey area.



Reproduced from Jayendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1994) *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Reproduced by permission.

Patrón de hinchamiento de HOST (Fuente: Manual de la OMS 2010)

2.5-El núcleo espermático y fragmentación del ADN

Uno de los factores evaluados recientemente como causa de infertilidad, es la integridad del ADN espermático de los núcleos de espermatozoides (Ollero y col., 2001; Sakkas y col., 1999). Este parámetro ha cobrado interés debido a la posibilidad de transmisión de enfermedades genéticas a través de la técnica de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) (Barroso y col., 2000).

Fisiológicamente, la maduración del espermatozoide es un proceso único que envuelve una serie de cambios mitóticos y meióticos y en la arquitectura citoplasmática, con sustitución de histonas por proteínas de transición y la adición final de protaminas en las células troncales, generando una cromatina bien empaquetada (Poccia, 1986), que ocupa casi todo el volumen nuclear. Normalmente la cromatina espermática es una estructura compacta y altamente organizada que contiene ADN y nucleoproteínas heterogéneas, para proteger la integridad genética y facilitar el transporte del patrón genómico paterno después de sufrir la descondensación. El ADN es organizado de una forma que mantiene la cromatina compacta dentro del núcleo (Pienta y Coffey, 1984).

En pacientes infértiles se ha reportado que la distribución anormal del material genómico se correlaciona negativamente con el potencial de fertilidad (Sun y col, 1997;

Spano y col., 2000) y se sugiere que la integridad del ADN es un marcador más objetivo de la función espermática que el propio análisis seminal estándar (Zini y col., 2001; Evenson y col., 2000). Además, los espermatozoides en el eyaculado son muy heterogéneos y parece más evidente en pacientes con parámetros seminales inferiores a los normales. La relación positiva entre pobre calidad espermática y ADN fragmentado conduce a problemas inherentes en la espermatogénesis en pacientes (Lopes y col., 1998). La cromatina nuclear anómala del espermatozoide podría originarse como resultado de un empaquetamiento inadecuado del ADN en la espermiogénesis (Sailer y col., 1995).

Existen dos metodologías principales para estudiar la fragmentación del ADN. La primera de ellas utiliza la marcación de las roturas tanto de cadena sencilla como de cadena doble, mediante la incorporación in situ de nucleótidos marcados, tales como la terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) (Lopes y col., 1998) o la In Situ Nick Translation (ISNT) (Manicardi y col., 1995). La segunda metodología incluye aquellas tecnologías que miden la distinta capacidad de la cromatina y en particular del ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas como el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (Evenson y col., 1980), el ADN Breakage Detection-Fluorescence in Situ Hybridization (DBD-FISH), una metodología que utiliza la hibridación in situ de ácidos nucleicos (Fernández y col., 2000), el ensayo bajo condiciones desnaturalizantes o la prueba Sperm Chromatin Dispersion (SCD) (Singh y col., 1988; Fernández y col., 2003).

En el presente trabajo de tesis se utilizó el ensayo SCD (Sperm Chromatin Dispersion), por ser un método simple y económico para el análisis de la fragmentación del ADN. Se basa en el principio de que los núcleos espermáticos que tengan un ADN fragmentado no producen el halo característico de dispersión, después de la desnaturalización y remoción de proteínas nucleares (Fernández y col., 2003). Esta técnica de SCD ha sido desarrollada en un kit comercial denominado halosperm. En los primeros estuches sacados al mercado era necesario observar los núcleos espermáticos con microscopio de fluorescencia (Fernández y col., 2003). Posteriormente desarrollaron una técnica que permite que la cromatina esté bien preservada y de elevada densidad, por lo que los halos coloreados con Wrigh, los cuales pueden observarse perfectamente utilizando un

microscopio de luz. Los autores concluyen que el nuevo protocolo de SCD con el kit halosperm, empleando microscopio de luz y coloración de Wright; es simple, de bajo costo y de fácil aplicación en la rutina de evaluación de la infertilidad, para evaluar la calidad de los núcleos espermáticos (Agarwal y Said, 2003).

La etiología del daño del ADN es variada y la consecuencia es la afección del estatus de la fertilidad. Un incremento anormal de leucocitos lesiona el ADN espermático asociado a infección o inflamación del tracto genital, como también incremento de células germinales en semen (Sigman y Lopes, 1993; Erenpreiss y col., 2002). Se ha reportado relación entre daño al ADN y muestras leucocitospérmicas (Alvarez y col., 2002). Una posible explicación a ello es la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) por los leucocitos (Comhaire y col., 1999).

Con relación a la influencia del varicocele sobre la estructura de la cromatina espermática y la movilidad, se ha señalado que el varicocele causa daño en el ADN del espermatozoide y cambios en la movilidad espermática, lo que puede resultar en infertilidad (Tang y col., 2009). Los espermatozoides de individuos con varicocele han sido evaluados con el kit de halosperm, los datos preliminares confirman el alto grado de degradación de los núcleos espermáticos (Chen y col., 2004). Los pacientes con varicocele presentan niveles elevados de ROS y un incremento de la apoptosis, esto podría estar vinculado con la fragmentación del ADN y a la disminución de la fertilidad en este grupo de pacientes (Moustafa y col., 2004; Caruso y col., 1999)

2.6-Prueba de unión al ácido hialurónico como indicador de la calidad de la membrana espermática

Se ha descrito que los espermatozoides maduros poseen enzimas del tipo hialuronidasas que son capaces de unirse al ácido hialurónico. Las hialuronidasas son un grupo de enzimas que catalizan el rompimiento del ácido hialurónico (HA), el cual es abundante en las matrices extracelulares. Las evidencias indican que las hialuronidasas son proteínas de membrana con funciones tanto enzimáticas como no enzimáticas, con

diferentes roles durante la fertilización, tales como penetración del cúmulo, unión a la zona pelúcida y unión al ácido hialurónico (Martin-Deleon, 2011).

Basados en la importancia de las hialuronidasas en el proceso de interacción de los gametos Huszar y col. 2003 propusieron el test de unión al ácido hialurónico comomarcador funcional de los espermatozoides, en el estudio del potencial de fertilidad, (Huszar y col, 2003)

El hialuron o Ácido Hialurónico (HA) es un importante glucosaminoglicano que regula varios procesos de reproducción (Ghosh y col., 2007). En un ensayo se observó que el incremento de la movilidad y la velocidad ocurre como respuesta directa a la presencia del HA y a la presencia de receptores específicos ubicados en la cabeza del espermatozoide. Estudios posteriores concluyen que solo los espermatozoides capaces de unirse al HA son maduros, viables y con acrosoma no reactivo que han completado la espermatogénesis: remodelación de la membrana plasmática, extrusión del citoplasma y la sustitución de histonas por protaminas (Huszar y col., 2003). Se ha establecido que, simultáneamente con la extrusión citoplasmática en la espermatogénesis, hay una remodelación de la membrana plasmática que facilita la unión de la zona pelúcida con receptores específicos para la unión del HA (Huszar y col., 1997; Kornovski y col., 1994; Bharadwaj y col., 2002).

Mediante la valoración de la concentración y la movilidad, otros trabajos han evaluado las propiedades de los espermatozoides unidos o no al ácido hialurónico, y se encontró una correlación positiva entre los espermatozoides maduros y unidos al HA con dichos parámetros seminales, también se indicó que la unión está asociada con receptores ubicados en la superficie del espermatozoide, la cual ocurre en diferentes grados y quizás está relacionada con el grado de madurez espermática. (Huszar y col., 1988; Huszar y Vigue, 1993). En la actualidad se han ideado técnicas de laboratorio para seleccionar espermatozoides que se unen al ácido hialurónico e inyectarlos al óvulo por la técnica de ICSI (Huszar y col., 2006).

En un estudio sobre tasa de Fertilización In Vitro (FIV), calidad espermática y la unión entre HA se encontró una correlación significativa con la movilidad, la morfología, el porcentaje de unión HA-espermatozoide maduro y el porcentaje de éxito con FIV. Sin

embargo, los autores señalan que la relación es menos significativa que la morfología en relación a la tasa de FIV. Contrariamente, se ha señalado que para lograr mayor éxito empleando Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), se recomienda realizar estudios combinados de maduración, función espermática y estudios cromosómicos, ya que la morfología espermática no es un buen indicador para la selección de espermatozoides haploides adecuados para lograr el embarazo aplicando dicha técnica. Los autores concluyen que el ensayo de selección visual de unión de espermatozoides al HA es una técnica eficaz que podría disminuir los problemas relacionados a ICSI (Ye y col., 2006).

www.bdigital.ula.ve

3-OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relación entre varicocele, marcadores de la función de las glándulas sexuales accesorias e indicadores de calidad espermática, tales como parámetros seminales, fragmentación del ADN y calidad de la membrana espermática determinada por la prueba de unión al ácido hialurónico.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del grado y lado anatómico del varicocele sobre la calidad seminal
2. Determinar la concentración en plasma seminal de marcadores bioquímicos de epidídimo, próstata y vesículas seminales en hombres normozoospermicos o con varicocele y establecer la relación con la calidad seminal.
3. Determinar la concentración de oligoelementos en plasma seminal en hombres normozoospermicos o con varicocele y establecer su relación con la calidad seminal.
4. Determinar los niveles del marcador de epidídimo alfa-glucosidasa neutra, fragmentación de ADN y la capacidad de unión de los espermatozoides al ácido hialurónico en pacientes con varicocele y establecer su relación con la calidad seminal.

4-CAPÍTULO I

Efecto del grado de varicocele y la edad sobre los parámetros seminales

4.1-Introducción

El varicocele se define como una dilatación de plexo pampiniforme del cordón espermático y se produce con mayor frecuencia en el lado izquierdo. La prevalencia de varicocele en la población general se estima que es de 15-20% (Meacham y col. 1994; Greenberg, 1977), mientras que está presente en 19-41% y 69-94% en hombres con infertilidad primaria e infertilidad secundaria respectivamente (Gorelick y Goldstein, 1993; Witt y Lipshultz, 1993). La etiología del varicocele es controvertida, con teorías que van desde variaciones anatómicas, a reflujo venoso secundario a disfunción valvular congénita y / o adquirida, a la obstrucción venosa (Naughton y col., 2001). Además, se ha propuesto que factores como los cambios de presión, la hipertermia, el flujo de sangre venosa y testicular, el reflujo de productos de origen renal / suprarrenal, la disfunción hormonal, la autoinmunidad, el estrés oxidativo y la apoptosis puede estar implicados en la patogénesis de varicocele (Agarwal y col., 2009; Shiraishiy col; 2009; Naughton y col., 2001).

Las lesiones vasculares del varicocele han sido arbitrariamente divididas en tres grados, en base a los hallazgos físicos: Grado III o gran varicocele: visible en el examen clínico, grado II o varicocele medio: distensión palpable de las estructuras del cordón espermático en la exploración vertical; varicocele grado I o pequeño: la distensión sólo es palpable durante la maniobra de Valsalva (Jarow, 2001; Redmon y col. 2002; World Health Organization, 1992). Generalmente el varicocele se observa solo en el lado izquierdo pero también puede ocurrir en ambos testículos (bilateral) o sólo en el testículo derecho. El varicocele derecho sin varicocele izquierdo es una condición rara y puede estar asociado a la compresión debida a un tumor retroperitoneal, un drenaje anormal en la vena renal derecha o la patología denominada *situs inversus* (Wilms y col. 1988).

Por otra parte se ha sugerido un efecto dependiendo del grado del varicocele y la bilateralidad en el potencial fértil del hombre, debido a los hallazgos que demuestran una mejoría en los parámetros seminales y probabilidad de embarazo luego de la varicocelectomía bilateral (Libman y col., 2006). El varicocele se asocia con una disminución general en la calidad del semen. Un amplio estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 1992), mostró que el varicocele se encontró en el 25% de los hombres con semen anormal, en comparación con el 11% de los hombres con semen normal. Además, el varicocele está acompañado por una disminución en el volumen testicular, una calidad seminal deteriorada y disminución de la secreción de células de Leydig, sugiriendo que varicocele está claramente asociada con el deterioro de la función testicular y la infertilidad. Asimismo, existen controversias acerca de si el varicocele ejerce un efecto deletéreo progresivo en la calidad del semen durante la edad adulta (Jarow, 2001), ya que se ha observado un aumento de la prevalencia de varicocele en hombres con infertilidad secundaria en comparación con los hombres con infertilidad primaria (Gorelick y Goldstein, 1997; Witt MA, Lipshultz, 1993). Sin embargo, el efecto perjudicial del aumento de la edad en la fertilidad en hombres con varicocele es todavía controvertido, porque no todos los pacientes son infértiles en la edad adulta aún cuando no han recibido tratamiento.

4.2-Objetivos

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) evaluar el efecto de la presencia de varicocele, localización anatómica y grado, en los parámetros del semen, y 2) identificar las modificaciones relacionadas con la edad en la calidad del semen en hombres con o sin varicocele que asistieron a una clínica de andrología.

4.3-Materiales y Métodos

2.1. Población de estudio

Todos los análisis se llevaron a cabo después de recibir aprobación de la junta institucional de la "Universidad de Los Andes", y después de que todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado. Se realizó un estudio de corte transversal de los pacientes que se presentaron para evaluación de infertilidad, entre enero de 2007 y mayo de 2009. Un total de 363 pacientes consecutivos con varicocele y 155 hombres normozoospermicos sin varicocele fueron seleccionados. Once pacientes con varicocele tenían azoospermia y no se incluyeron en el análisis estadístico de los parámetros seminales. Fueron excluidos los pacientes azoospermicos, por tal motivo el número de individuos se redujo a 352.

Todos los pacientes fueron evaluados por dos especialistas en infertilidad masculina, con una historia médica completa, un examen físico y análisis de semen. El varicocele se clasificó clínicamente como de grado I (palpable de Valsalva), grado II (palpable sin Valsalva) o grado III (visible a través de la piel del escroto), izquierdo, derecho o bilateral. El diagnóstico de varicocele fue confirmado por eco Doppler.

2.2- Análisis de semen

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia eyaculatoria. Después de la licuefacción del semen, se realizó el análisis seminal de acuerdo a criterios de la OMS (World Health Organization, 2001). Los valores de referencia para esa edición de la OMS son: motilidad del espermática total $(a + b) \geq 50\%$ $(a + b)$, concentración de espermatozoides $\geq 20 \times 10^6$ por mililitro y espermatozoides con formas normales $\geq 30\%$.

La prueba hipoosmótica (HOST) se realizó mezclando 0,1 ml de semen con 1,0 ml de una solución hipoosmótica preparada de la siguiente forma: 7,3 g de citrato de sodio y 13,5 g de fructosa y 1000 ml de agua destilada (Jeyendran y col., 1984). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37° C, luego los espermatozoides fueron examinados bajo un microscopio de contraste de fase a 400x. Doscientos espermatozoides fueron evaluados.

Los PMN se evaluaron mediante la tinción de mieloperoxidasa: El procedimiento empleado fue el siguiente: 20 μ L de muestra se colocó en 1 ml de solución de trabajo. El recuento de 200 células peroxidasa-positivas (teñidas de color café) y células peroxidasa-negativa (incolores), se realizó en hemocitómetro usando un microscopio de contraste de fase a 400x. La solución de trabajo se preparó mezclando 2 ml de solución salina de tampón fosfato (pH 7,0) y 4 ml de solución de bencidina (0,0125% p/v con 0,0375% de H_2O_2) (WHO, 2010).

2.3- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con SPSS 10,0 software estadístico para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante un ANOVA, Tukey HSD con una prueba a posteriori, para valores normalmente distribuidos. Las diferencia entre el rango de grupos por edad, se determinó mediante la prueba de la *t de Student*. Se realizó la prueba de coeficiente de Pearson para evaluar la relación entre la edad y los parámetros del semen en grupo control y con varicocele. Los valores de *p* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

www.bdigital.ula.ve

4.4 Resultados

La Tabla 1 muestra las características del semen: volumen, concentración espermática, morfología normal, motilidad, vitalidad, prueba hipoosmótica, en el total del grupo con varicocele, con varicocele izquierdo (en el grado I, II y III), derecho y bilateral.

No se observaron diferencias en el volumen de semen y la concentración de espermatozoides entre los grupos con y sin varicocele. El porcentaje de la morfología normal de espermatozoides, la movilidad, la vitalidad y HOST, disminuyó en el grupo total con varicocele en comparación con los normozoospermicos. Por otra parte la concentración de neutrófilos o granulocitos polimorfonucleares por ml estuvo aumentada en el grupo con varicocele total ($p < 0,001$) en comparación con el grupo sin varicocele ($1,0 \pm 0,9$ vs $0,5 \pm 0,2$, respectivamente)

Para evaluar si un aumento en el grado de varicocele provocaba un incremento en el daño en los parámetros seminales se aplicó la prueba estadística ANOVA para la

comparación de los parámetros seminales entre grupos de varicocele izquierdo con diferentes grados (I, II, III). Los resultados mostraron que la morfología de los espermatozoides normales disminuyó significativamente en el grado III varicocele en comparación con el varicocele izquierdo Grado I.

Para determinar la influencia de la localización anatómica del varicocele (izquierda, derecha o bilateral) en los parámetros seminales se realizó la prueba estadística ANOVA comparando el varicocele izquierdo total (I + II + III), con el bilateral y el derecho. El resultado mostró que el grupo con varicocele derecho presentó un mayor porcentaje de espermatozoides con morfología normal que el grupo con varicocele izquierdo.

La Tabla 2 muestra la clasificación de los pacientes con varicocele sobre la base de criterios de la OMS y su relación con el grado de varicocele y la localización anatómica. Es importante señalar, que en el grupo con varicocele izquierdo grado I como en el varicocele derecho, aproximadamente la mitad de los pacientes eran normozoospermicos, mientras que estos porcentajes disminuyeron en los otros grupos, pero principalmente en el varicocele izquierdo grado III, donde sólo el 24% de los pacientes tenían parámetros seminales normales.

En el varicocele izquierdo grado I el parámetro más afectado fue el de la movilidad de los espermatozoides y en segundo lugar la morfología. En varicocele izquierdo grado II la motilidad y morfología de los espermatozoides estuvieron disminuidos y además, presentaron un alto porcentaje de pacientes con Oligoastenoteratozoospermia (15,3%). El grupo con varicocele bilateral y, en particular, en los hombres con varicocele izquierdo de grado III, el parámetro más afectado fue el de la morfología de los espermatozoides. Además, el porcentaje más alto de pacientes con azoospermia se observó en el grupo de varicocele derecho, sin embargo hubo casos de azoospermia en todos los grupos evaluados.

La comparación de cada grupo de varicocele en rangos de edad, con su equivalente sin varicocele (Tabla 3) demuestra disminución estadísticamente significativa de la motilidad la morfología espermática normal, vitalidad y prueba HOST en pacientes con varicocele en todos los rangos de edad. La morfología de los espermatozoides sólo se

redujo en el grupo de varicocele en la clase de edad 21-30 y 31-40 en comparación con el grupo control.

El estudio de correlación de Pearson en el grupo sin varicocele normozoospermicos no mostró ninguna correlación entre la edad y los parámetros seminales. Al contrario, en el grupo varicocele mostraron una correlación negativa significativa ($r = -0,13$, $p < 0,05$) entre el aumento de la edad y la disminución de la motilidad espermática (a + b).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1: Características seminales del grupo control y el grupo total de pacientes con varicocele izquierdo (grado I, II, III), derecho y bilateral

Grupo	Edad (años)	Volumen (mL)	Espermatozoide (x10 ⁶ /eyaculad)	Morfología (% normal)	Movilidad (a+b, %)	Vitalidad (%)	HOST (%)	PMN (x 10 ⁶ /mL)	PMN (x 10 ⁶ /eyaculado)
Control (n=155)	32,3±7,5 ^a	3,7±1,0 ^a	242,9±178,5	36,5±5,8 ^c	69,1± 10,2 ^c	80,1±4,7 ^c	67,6±2,7 ^c	0,5±0,2 ^c	1,9±1,0 ^c
Varicocele total (n=364)	28,5±8,8	3,4±1,6	230,0±198,0	30,1±11,5	49,8±21,4	60,9±19,9	48,5±17,4	1,0±0,9	4,0±4,1
Varicocele Izquierdo (I) (n=80)	29,4±8,2	3,5±1,6	243,1±195,4	30,5±12,3	50,7±23,7	58,9±21,5	49,2±19,6	1,0±0,9	3,8±3,0
Varicocele Izquierdo (II) (n=117)	27,7±9,1	3,4±1,7	206,7±186,7	30,5±10,1	48,6±19,7	61,5±19,4	47,2±14,9	1,1±1,1	4,4±5,4
Varicocele Izquierdo (III) (n=41)	24,0±7,0	3,4±1,8	230,9±167,4	27,0±10,2 ^c	48,7±21,9	60,6±20,2	46,4±19,7	0,8±0,7	3,6±3,3
Varicocele Bilateral (n=105)	31,4±10,3	2,8±1,3 ^b	216,6±218,0	34,8±18,3	49,3±25,1	62,3±23,0	46,7±21,7	1,2±1,1 ^d	3,6±2,7
Varicocele Derecho (n=20)	29,9±8,6	3,6±1,6	248,5±219,1	29,5±11,0	51,0±21,0	61,4±18,7	50,6±16,6	0,9±0,6	5,2±6,2

Los valores se expresan como media ± SD. HOST: Test hipoosmótico. PMN: leucocitos polimorfonucleares. ^ap<0.05 vs varicocele total. ^bp<0.0002 vs varicocele total y todos los grados. ^cp<0.0001 vs varicocele total y todos los grados. ^dp<0.001 vs varicocele total. ^ep<0.001 vs varicocele total y todos los grados

Tabla 2: Características seminales en individuos con varicocele (n=363), de acuerdo a los criterios de la OMS y grado de varicocele.

	Pacientes n° (%)	Edad (años)	Volumen (mL)	Vitalidad (%)	HOST (%)	PMN/mL (%)	Varicocele I n° (%)	Varicocele II,III,D,B. n° (%)
Normozoospermia	114 (31,4)	27,6±8,2	3,7±1,5	68,5±13,2	57,2±11,2	1,1±0,8	33 (28,9)	81 (71,1)
Astenozoospermia	73 (20,1)	28,4±8,3	3,3±1,4	60,3±1,3 ^b	53,6±13,4	1,1±1,0	15 (20,5)	58 (79,5)
Astenoteratozoospermia	66 (18,2)	30,2±10,1	3,4±1,6	57,2±16,1 ^b	46,8±13,4 ^b	1,0±0,7	15 (22,7)	51 (77,3)
Teratozoospermia	27 (7,4)	26,9±8,4	3,8±1,8	71,8±12,4	49,0±14,0 ^c	1,1±1,1	4 (14,8)	23 (85,2)
Oligoastenoteratozoospermia	45 (12,4)	28,6±8,1	3,5±2,1	50,4±23,6 ^b	35,8±18,7 ^b	0,7±0,4 ^c	7 (15,6)	38 (84,4)
Azoospermia	16 (4,4)	31,0±8,2	3,0±1,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,7±0,7 ^a	5 (31,3)	11 (68,7)
Oligoastenozoospermia	10 (2,8)	29,3±14,0	1,7±1,3 ^a	68,4±12,9	45,2±14,2 ^a	0,8±0,9	0 (0,0)	10 (100,0)
Oligozoospermia	10 (2,8)	29,4±8,3	2,2±1,4	73,1±10,6	44,0±7,8 ^b	0,6±0,6	1 (9,1)	9 (90,9)
Oligoteratozoospermia	2 (0,5)	21,0±0,0	4,1±0,1	64,0±5,7	56,5±12,0	0,1±0,0	0 (0,0)	2 (100,0)

Los valores se expresan como media ± SD. HOST: Test hipoosmótico. PMN: leucocitos polimorfonucleares. Varicocele izquierdo (grado I, II, III), derecho (D) y bilateral (B). ^ap<0.01, ^bp<0.001, ^cp<0.003 vs el grupo normozoospermico.

Tabla 3. – Características seminales de los individuos en estudio (control y con varicocele) de acuerdo al rango de edad.

	Control				Grupo total con varicocele			
	< 20 años (n=8)	21-30 años (n=60)	31-40 años (n=60)	>40 años (n=27)	< 20 años (n=65)	21-30 años (n=166)	31-40 años (n=97)	>40 años (n=35)
Volumen (mL)	3,7±1,1 ^a	3,7±1,0	3,7±1,1	3,7±1,1	2,9±1,6	3,7±1,6	3,5±1,6	3,1±1,7
Espermatozoides x10 ⁶ /eyaculado	64,2±41,5	63,8±42,7	72,0±41,4	51,7±29,5	81,0±54,8	73,5±47,5	60,68 ±49,4	70,5±45,8
Morfología (% normal)	34,5±3,3	37,2±6,2 ^b	37,3±5,5 ^b	33,9±5,6	31,8±9,3	31,1±11,0	26,7±13,1	30,9±11,3
Movilidad (a+b, %)	65,8±4,9 ^a	68,8±9,2 ^b	69,3±9,4 ^b	65,3±8,0 ^b	50,0±18,9	53,6±19,6	44,6±25,0	45,8±20,9
HOST (%)	66,9±1,0 ^c	67,7±2,8 ^b	67,8±3,0 ^b	67,0±1,7 ^b	49,4±15,3	51,4±16,1	43,7±20,4	46,3±15,7
PMN (x 10 ⁶ /mL)	0,7±0,2	0,5±0,2 ^b	0,5±0,2 ^c	0,6±0,2 ^c	1,1±0,8	1,0±0,9	0,9±1,0	1,0±0,7

Los valores se expresan como media ± SD. HOST: Test hipoosmótico. PMN: Leucocitos polimorfonucleares. ^a p<0.01, ^b p<0.001, ^c p<0.005 vs el grupo con varicocele en el mismo rango de edad. Los pacientes con azoospermia fueron excluidos.

4.5-Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que la presencia de varicocele, en todos sus grados, se asoció con una disminución de la calidad seminal, evaluada por morfología, motilidad, vitalidad, y la prueba hipoosmótica, en comparación con el grupo de hombres normozoospermicos sin varicocele. Sin embargo, la concentración de espermatozoides no se vio afectada por varicocele. Nuestros resultados están de acuerdo con otra publicación (Andrade-Rocha, 2007) que sugiere que el varicocele afecta principalmente la calidad seminal, más que la producción de espermatozoides.

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar el efecto del grado de varicocele con la alteración de los parámetros del semen. Algunos autores han sugerido un efecto "grado dependiente" del varicocele sobre la espermatogénesis (Libman y col., 2006; Richardson y Nagler, 2007). Se ha propuesto que hay dos mecanismos por los cuales un individuo puede experimentar diferentes "grado" de varicocele: tener varicocele de mayor grado o tener varicocele bilateral. En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre los grados de varicocele en volumen seminal, concentración, motilidad y la prueba de hipoosmótica. Una reciente investigación en adolescentes demostró que el varicocele en los grados II y III causa una disminución en el volumen testicular y en la calidad del semen que es independiente del grado, sin embargo, se ha encontrado una disminución de espermatozoides con motilidad progresiva en el grado III, en comparación con el II (Mori y col., 2008). En nuestro estudio el grupo con varicocele izquierdo grado III fue el grupo que presentó el promedio más bajo de la edad, esto sugiere que este grado de gravedad de varicocele se puede lograr muy temprano en la vida del paciente.

La concentración de espermatozoides, la motilidad y HOST estuvieron influenciados por el grado del varicocele (I, II o III), mientras que el porcentaje de morfología espermática normal se afectó negativamente principalmente en el grado III, en comparación con el grado I. Este hallazgo también se apreció al comparar a los pacientes tomando en cuenta la clasificación de la OMS, así el resultado de la suma de todas las categorías de pacientes con mala morfología espermática (Asteneratozoospermia + Teratozoospermia + Oligoteratozoospermia + Oligoasteneratozoospermia) alcanza a 65,8% en los pacientes con varicocele grado III.

Un estudio previo demostró que el endotelio aislado de venas varicosas espermáticas humanas produce menos vasorelajantes, (en este estudio se evaluó la respuesta contráctil a fenilepinefrina, norepinefrina, serotonina e histamina en venas varicosas espermáticas aisladas de pacientes con diferentes grados de varicocele, observándose mayor contracción en varicocele grado III), lo que resulta en aumento de los efectos de sustancias vasoconstrictoras en el varicocele grado III, sugiriendo que una disfunción endotelial podría desarrollarse en altos grados de varicocele (Yildiz y col., 2003), lo que podría afectar la morfología normal de los espermatozoides en el varicocele grado III.

Por otra parte, al clasificar a los pacientes según los criterios de la OMS se observa que la mitad de pacientes con varicocele izquierdo de grado I, o varicocele derecho, presentaron parámetros seminales normales. Además se pudo demostrar que porcentaje de pacientes normozoospermicos disminuye a medida que aumenta el grado de varicocele, así sólo el 24% de los pacientes con varicocele grado III presenta un análisis de semen normal.

La morfología de los espermatozoides y los parámetros seminales estuvieron menos afectados en los pacientes con varicocele derecho que en el grupo con varicocele izquierdo. Estudios previos indican que el varicocele derecho puede tener una etiología diferente al del varicocele izquierdo, este puede estar asociado con la presencia de un tumor retroperitoneal de compresión, un drenaje anormal en la vena renal derecha o la patología situs inversus (Wilms y col., 1998), que podría estar asociada con la disminución del volumen seminal observada en este grupo.

Otro objetivo de esta investigación fue evaluar si a medida que aumenta la edad de los pacientes con varicocele aumenta el daño espermático, en hombres con varicocele no tratados. Estudios previos han sugerido que el varicocele puede ser una lesión progresiva porque el mismo se encuentra en el 35% de los hombres con infertilidad primaria y el 81% de los hombres con infertilidad secundaria (Gorelick y Goldstein, 1993; Chehval y Purcell, 1992). Una investigación reciente señala que es difícil determinar si el varicocele puede justificar la infertilidad secundaria (debido a que estos hombres han pasado más tiempo expuestos al varicocele) porque las parejas de estos hombres también tienen mayor edad así el potencial reproductivo puede estar afectado por la edad materna (Walsh y col., 2009).

En esta investigación, los grupos con y sin varicocele se clasificaron en rangos de edad, y cada grupo se comparó con su equivalente. La comparación de cada grupo de varicocele con su equivalente sin varicocele demuestra una significativa disminución estadísticamente significativa en la morfología normal de espermatozoides, la motilidad, la vitalidad y HOST en pacientes con varicocele en casi todos los grupos de edad, lo que indica que el varicocele *per se* afecta a los parámetros seminales en todos los rangos de edad. Del mismo modo, Andrade-Rocha (Andrade-Rocha, 2007) comparó los parámetros seminales en pacientes con varicocele por rangos de edad con un grupo control fértil, llegando a la conclusión de que el varicocele daña igualmente las características de los espermatozoides de los adolescentes, adultos y ancianos.

En nuestro estudio no se realizó un estudio longitudinal para determinar el efecto de varicocele con el tiempo. Sin embargo, el estudio de correlación en el grupo sin varicocele no muestra correlación entre la edad y los parámetros seminales. En contraste, en el grupo varicocele se encontró una correlación negativa entre el aumento de la edad y la disminución de la motilidad de los espermatozoides, lo que sugiere que en los pacientes con varicocele los porcentajes de motilidad de los espermatozoides pueden deteriorarse con el tiempo.

Un hallazgo importante de nuestro estudio fue el aumento de polimorfonucleares en pacientes con varicocele. Es difícil de evaluar en la literatura cual es el promedio de leucocitos en el semen durante varicocele, porque muchos estudios excluyen a los pacientes con más de un millón de células blancas por ml, mientras que otros los separan en dos poblaciones (Pasqualotto y col., 2000), uno con menos y otro con más de 1×10^6 /ml (leucocitospermia criterios de la OMS). Sin embargo, un estudio anterior encontró un aumento en la concentración de PMN (media $0,7 \times 10^6$ /mL) en pacientes con varicocele similar a lo hallado en nuestro estudio (Blumer y col., 2008).

No se conoce el origen de los polimorfonucleares presentes en el semen. El semen se forma por el aporte de las secreciones del epidídimo, próstata y las vesículas seminales (y glándulas y bulbouretral), estas glándulas pueden ser la fuente de los leucocitos. El epidídimo y la próstata se consideran las principales fuentes de leucocitos seminales (Simbini y col., 1998). Un estudio en pacientes a los cuales se les había realizado la

vasectomía indicó que el epidídimo es la fuente del 90% de los leucocitos en semen (Olsen y Shields, 1994) y los estudios en ratas han demostrado la presencia de leucocitos en el epidídimo (Flickingery col., 1997). Es posible que los cambios vasculares observados durante varicocele puedan afectar tanto al funcionamiento de los testículos como del epidídimo. En los pacientes con varicocele se ha observado modificaciones en la barrera hemato-testicular, con reducción de la expresión de E-cadherina y α -catenina en las uniones entre las células de Sertoli adyacentes, este resultado podría explicar el aumento de los leucocitos en el semen de los hombres con varicocele (Koksal y col., 2007), sin embargo se necesita realizar más estudio para dilucidar el origen de los leucocitos en semen.

En conclusión, la comparación de los parámetros del semen entre diferentes grados de varicocele izquierdo (I, II o III) muestra que el porcentaje promedio de espermatozoides con morfología normal se reduce en grado III, mientras que los otros parámetros parecieran no verse afectados. Sin embargo, cuando se determina el porcentaje de pacientes normozoospermicos para cada grado de varicocele se encontró que la mitad de los pacientes con varicocele izquierdo de grado I, tienen parámetros seminales normales, mientras que sólo el 24% de los pacientes con varicocele grado III. Los parámetros más afectadas en los hombres con varicocele grados II y III, fueron la motilidad y morfología. Estos resultados sugieren que el grado de varicocele determina el grado de alteración en la calidad del semen. Además se observó una correlación negativa entre el aumento de edad y la disminución de la motilidad del espermatozoide en el grupo varicocele, sin afectar los otros parámetros seminales, lo que indica que la calidad del semen podría disminuir con el tiempo en hombres con varicocele.

5-CAPÍTULO II

Marcadores de las secreciones de las glándulas accesorias sexuales en hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales

5.1-Introducción

Las glándulas sexuales accesorias juegan un papel importante en la adquisición de potencial de fertilización de los espermatozoides. Se ha informado de que la motilidad espermática puede estar influida por los componentes del plasma seminal (Elzanaty y col., 2002; Zöpfigen y col., 2000). El semen está constituido por la contribución del fluido del testículo-epidídimo (<10%), la próstata (% 20-40); las vesículas seminales (50-80%) y las glándulas uretrales y bulbouretrales (<10%) (Ndovi y col., 2007). Cada glándula contribuye con diferentes moléculas en la eyaculación: carnitina, alfa glucosidasa neutra y glicerofosocolina del epidídimo; citrato, zinc y fosfatasa ácida prostática de próstata; y fructosa y prostaglandinas a partir de las vesículas seminales (Saïd y col., 2009).

El varicocele se ha asociado con disminución de la calidad de los parámetros seminales (Andrade-Rocha, 2007; Agarwal y col., 2007; Vivas-Acevedo y col., 2010). Sin embargo, existe poca información sobre el efecto del varicocele sobre la función y la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Andò y col., 1990; Roaiah y col., 2007) y la posible relación con la composición de los marcadores bioquímicos del semen y los parámetros seminales.

5.2-Objetivo

El propósito de este estudio fue explorar, en hombres con varicocele, la relación entre los marcadores bioquímicos de la secreción de glándulas sexuales accesorias, mediante cuantificación de fructosa de las vesículas seminales, alfa glucosidasa neutra (NAG) del epidídimo, fosfatasa ácida prostática (PAP) y la actividad de zinc de la próstata, con los parámetros seminales.

5.3-Materiales y métodos

Pacientes

Todos los análisis se han realizado después de obtener la aprobación del consejo institucional y de que cada uno de los pacientes diera su consentimiento expreso. Se llevó a cabo un estudio de corte transversal con pacientes en evaluación de infertilidad en un centro de diagnóstico (Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades genéticas, Mérida), entre enero de 2007 mayo de 2009.

Fueron excluidos de este estudio los hombres con enfermedades urogenitales (actuales o pasadas), los pacientes positivos a anticuerpos anti-Chlamydia C (EIA kit ImmunoComb monovalente IgA II ORGENIC, Israel), los hombres con azoospermia o con normogonadismo.

Se incluyeron un total de ciento noventa (190) pacientes con varicocele (Grado I: 42; Grado II: 66; Grado III: 23; Bilateral: 59). El varicocele se clasificó clínicamente como de grado I (palpable con la maniobra de Valsalva), grado II (palpable sin maniobra de Valsalva), grado III (visible a través de la piel del escroto) o bilateral (algún grado de varicocele en ambos testículos). El diagnóstico de varicocele se confirmó mediante ecografía Doppler. Además, cien hombres (100) sin varicocele y normozoospermicos se seleccionaron como grupo de control. Todos los pacientes fueron evaluados por dos especialistas en infertilidad masculina (historia clínica, el examen físico y los criterios de inclusión-exclusión) y se realizó un análisis del semen.

Análisis de Semen

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia eyaculatoria. Después de la licuefacción del semen, el análisis seminal se realizó de acuerdo a criterios de la OMS (World Health Organization, 1992). Para ese Manual de la OMS los valores de referencia son los siguientes: concentración espermática $\geq 20 \times 10^6$ por ml, movilidad $\geq 50\%$ (progresivos rápidos y lentos, a + b) y formas normales de espermatozoides $\geq 30\%$.

La prueba hipoosmótica (HOST) se realizó mediante la mezcla de 0,1 ml de semen con 1,0 ml de una solución hipo-osmótica preparada de la siguiente manera: 7,3 g de citrato de sodio y 13,5 g de fructosa y 1000 ml de agua destilada (Jeyendran y col., 1984). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C, los espermatozoides fueron examinados bajo microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. Doscientos espermatozoides fueron evaluados. Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), se evaluaron por el método Endtz (1974) (Endtz, 1974) modificado por Politch y col., (1993) (Politch y col., 1993) o tinción de mieloperoxidasa. El procedimiento empleado fue el siguiente: se colocó 20 µL de muestra en 1 ml de solución de trabajo. Se realizó el recuento de 200 células peroxidasa-positivas (teñidas de color café) y células peroxidasa-negativa (incolores), en hemocitómetro usando un microscopio de contraste de fase a 400x. La solución de trabajo se preparó mezclando 2 ml de solución salina de tampón fosfato (pH 7,0) y 4 ml de solución de bencidina (0,0125% p/v con 0,0375% de H₂O₂).

Análisis bioquímicos

La concentración de fructosa seminal fue medida según el método colorimétrico de Mann (Mann, 1964; Lewis-Jones y col., 1996), usando ácido resorcinol; 50µl de plasma seminal desproteinizado se mezcló con 1,0 ml de ácido resorcinol para dar una reacción de color. La actividad de la fosfatasa ácida prostática fue analizada por medio de la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato. El plasma seminal se diluyó 1:10.000 en agua destilada y p-nitrofenil fosfato fue usado como sustrato. La medición colorimétrica fue realizada a 480 nm (Andolz y Bielsa, 1995).

La concentración de zinc en semen fue medida por el método colorimétrico descrito por Johnsen y Eliasson, modificada por Cooper y col., (Cooper y col., 1991). La prueba se basa en que el compuesto 2 - (5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulphopropylamino)-fenol (5-Br-PAPS) se une con zinc, produciendo un cambio en un color, que absorbe luz a una longitud de onda en el rango de 560 nm.

La alfa glucosidasa neutra se midió en todas las muestras de plasma seminal de acuerdo con el método fotométrico descrito por Guérin y col. (Guerin y col., 1986). El

plasma seminal contiene tanto la isoenzima alfa glucosidasa de tipo neutro, que se origina en el epidídimo, y una isoenzima ácida proporcionada por la próstata. Esta última puede ser selectivamente inhibida por dodecil sulfato sódico (SDS) para permitir la medición de la alfa-glucosidasa neutra, que refleja la función del epidídimo. Para evitar la descomposición de sustrato no relacionados con glucosidasa se utilizó el inhibidor castanospermina, esto hace que el ensayo sea más sensible. El sustrato (paranitrofenilo α D-glucopiranosido) se hidroliza específicamente por la alfa glucosidasa neutra en paranitrofenilo, luego de la incubación por dos horas a 37 ° C, pH 6,8. La cantidad de paranitrofenilo se mide usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Una unidad internacional (IU) de actividad de glucosidasa se define como la producción de 1 mol de producto (p-nitrofenilo) por minuto a 37 ° C, pH 6,8.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS 10,0 software estadístico para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Básicos estadística descriptiva (media \pm DE) se calcularon para grupos varicocele (grados I, II, III y bilateral) y el grupo control. Las diferencias entre el grupo de varicocele total y grupo de control se determinó mediante la prueba t. Las diferencias entre el grupo de varicocele (diferentes grados) y de control se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y LSD pos comparación hoc para valores distribuidos normalmente. Coeficiente de correlación de Pearson se ha realizado, los valores de p por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

5.4-Resultados

La edad media del grupo control fue de $32,3 \pm 7,1$ años, mientras que la del grupo con varicocele fue de $28,4 \pm 9,4$ ($p < 0,05$). Debido a que la edad puede afectar los resultados de los parámetros seminales, se realizó un análisis de varianza utilizando la edad como covariable. La Tabla 1 muestra los parámetros seminales en el grupo control y el grupo con varicocele. No hubo diferencias significativas en la concentración de

espermatozoides/ml entre el grupo de varicocele total (grado I + II + III + bilateral) y grupo control (datos no mostrados). Sin embargo, los porcentajes de los siguientes parámetros seminales fueron estadísticamente superiores ($p < 0,0001$) en el grupo de control que en el grupo con varicocele: motilidad a + b, la morfología normal, prueba hipoosmótica y vitalidad de los espermatozoides. La concentración polimorfonucleares (PMN) /eyaculado estuvo incrementada en el grupo con varicocele en comparación con el control.

La Tabla 2 muestra los niveles de fructosa, la actividad de la fosfatasa ácida prostática, los niveles de zinc y de la actividad alfa glucosidasa neutra en el semen en el grupo control, grupo total con varicocele y los subgrupos con varicocele: grado I, II, III y bilateral. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el control y el grupo total de varicocele en niveles seminales de: fructosa, PAP y zinc. Por otra parte, la actividad del marcador epidídimo, la alfa glucosidasa neutra (NAG), estuvo disminuida en pacientes con varicocele. El análisis de varianza análisis post hoc (LSD) mostró que la NAG mU / eyaculado estuvo disminuida en todos los grados de varicocele.

La Tabla 3 muestra los estudios de correlación entre fructosa, PAP, zinc, NAG en el plasma seminal y los parámetros seminales en el grupo total de hombres evaluados (control + varicocele). Se observó una correlación positiva entre fructosa y PAP con las siguientes variables: volumen, concentración espermática, PMN, y zinc. Además la concentración de zinc se correlacionó positivamente con el volumen del semen, la concentración de espermatozoides, la motilidad progresiva y células polimorfonucleares y se asoció negativamente con la vitalidad de los espermatozoides. Por otra parte, la NAG se correlacionó positivamente con: morfología espermática normal, la motilidad progresiva, vitalidad de los espermatozoides y el test hipoosmótico.

Tabla 1 Parámetros seminales en el grupo control y el grupo con varicocele.

	Control (n=100)	Varicocele (n=190)	<i>p</i> valor
Volumen (mL)	3,7 ± 1,0	3,6 ± 1,7	ns
Espermatozoides x 10 ⁶ /mL	63,9 ± 41,1	71,5 ± 48,5	ns
Movilidad a+b (%)	68,7 ± 10,2	53,2 ± 20,0	0,0001
Morfología (% normal)	37,1 ± 6,6	31,8 ± 9,7	0,0001
HOST (%)	67,7 ± 2,8	50,4 ± 15,8	0,0001
Vitalidad (%)	80,8 ± 4,8	66,3 ± 16,1	0,0001
PMN/eyaculado	1,8 ± 0,9	3,7 ± 3,0	0,0001

El grupo denominado “control” estuvo conformado por hombres sin varicocele y normozoospermicos.

HOST: Test hipo-osmótico. PMN: Leucocitos polimorfonucleares

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2 Marcadores de glándulas sexuales accesorias en el grupo control y el grupo con varicocele.

	Control (n=100)	Varicocele total (n=190)	<i>p</i> valor	Varicocele Grado I (n=42)	Varicocele Grado II (n=66)	Varicocele Grado III (n=23)	Varicocele Bilateral (n=59)
Volumen (mL)	3,7 ± 1,0	3,6 ± 1,7	ns	3,5 ± 1,7	3,5 ± 1,6	3,7 ± 2,0	3,7 ± 1,7
Fructosa (mg/eyaculado)	967,8 ± 311,7	1026,4 ± 673,9	ns	1085,8 ± 735,0	944,3 ± 575,9	1130,4 ± 919,2	1035,5 ± 625,7
PAP (U/eyaculado)	2360,5 ± 807,9	2531,3 ± 1655,4	ns	2650,3 ± 1503,1	2424,4 ± 185,2	2772,3 ± 1997,2	2472,3 ± 1455,2
Zinc (µmol/eyaculado)	10,5 ± 8,1	11,8 ± 7,5	ns	10,8 ± 6,7	12,5 ± 7,6	8,9 ± 9,5	13,0 ± 6,8
NAG (mU/eyaculado)	33,0 ± 8,5	15,8 ± 7,7 ^a	<0,0001	16,0 ± 7,0 ^a	14,6 ± 6,7 ^a	16,3 ± 7,4 ^a	16,9 ± 9,3 ^a

Los valores se expresan como media ± SD. PAP: Fosfatasa ácida prostática. NAG: Alfa Glucosidasa Neutra. Varicocele total: I+II+III+Bilateral ^aComparación con el grupo control.

Tabla 3 Coeficiente de correlación entre marcadores de glándulas sexuales accesorias y parámetros seminales en el total de individuos evaluados (n=290).

	Correlación	r Pearson
↑ Fructosa (mg/eyaculado)	↑ volumen	0,77
	↑ Concentración espermatozoides/eyaculado	0,26
	↑ PMN/eyaculado	0,42
	↑ PAP (U/eyaculado)	0,44
	↑ Zinc (μmol/eyaculado)	0,41
↑ PAP (U/eyaculado)	↑ volumen	0,65
	↑ Concentración espermatozoides/eyaculado	0,31
	↑ PMN/eyaculado	0,37
	↑ Zinc (μmol/eyaculado)	0,41
↑ Zinc (μmol/eyaculado)	↑ volumen	0,62
	↑ Concentración espermatozoides/eyaculado	0,40
	↑ Movilidad a+b	0,12
	↑ PMN/eyaculado	0,37
↑ NAG (mU/eyaculado)	↑ Morfología Normal	0,14
	↑ Movilidad a+b	0,23
	↑ Vitalidad	0,26
	↑ HOST	0,32
	↓ PMN/eyaculado	-0,19

Todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

PAP: Actividad de la fosfatasa ácida prostática. NAG: alfa glucosidasa neutra.

PMN: Leucocitos polimorfonucleares. HOST: Test hipoosmótico

5.5-Discusión

En el presente estudio fueron evaluados los marcadores del epidídimo, próstata y las vesículas seminales así como los parámetros seminales en los hombres normozoospermicos y pacientes con varicocele, para determinar si el varicocele puede afectar la secreción de las glándulas sexuales accesorias. No se observaron diferencias en los niveles de fructosa, PAP y zinc entre hombres normozoospermicos y pacientes con varicocele. Al igual que en nuestro estudio, Ando y col., (Andò y col., 1990) no observaron diferencias en las concentraciones de fructosa, sin embargo, encontraron una disminución de la PAP y la concentración de zinc en pacientes con varicocele, la diferencia puede explicarse porque en el presente estudio hemos utilizado técnicas modificadas para el zinc y el PAP, mientras ellos emplearon las técnicas originales.

Encontramos que porcentaje de espermatozoides con morfología normal, motilidad, vitalidad y HOST estuvo reducido en pacientes con varicocele. Una investigación previa de nuestro laboratorio (Vivas-Acevedo y col., 2010), mostró un análisis detallado de la relación entre los grados de varicocele con los parámetros seminales, informando de que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue el único parámetro que cambió dependiendo del grado del varicocele, disminuyendo en hombres con varicocele grado III, mientras que los otros parámetros no se vieron afectados en relación con los grados de varicocele, lo que indica que los parámetros seminales se ven afectadas por la presencia de varicocele al comparar con el grupo control, independientemente del grado.

La actividad de NAG se redujo significativamente en el grupo total de varicocele, se encontraron resultados similares en un estudio anterior (Roaiyah y col., 2007), sin embargo, este es el primer estudio que muestra que la actividad NAG disminuyó en todos los grados de varicocele, podría ser posible que la presencia de varicocele, sin importar el grado, afecte la función del epidídimo. NAG es secretada por el epitelio del epidídimo, principalmente por el cuerpo y la cola (Cooper y col., 1990). El varicocele experimental en la rata produce efectos perjudiciales del epitelio del epidídimo con aparición de espermatozoides deformes y macrófagos en el lumen del epidídimo y también una reducción significativa de la actividad de NAG en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo (Zhang y col., 2003). Unos estudios previos indican una asociación positiva entre NAG y

motilidad de los espermatozoides, al igual que en nuestro estudio (Roaiyah y col., 2007; Mahmoud y col., 1998), mientras que otra investigación no mostró correlación (Levrant y col., 2009).

El epidídimo desempeña un papel importante en la maduración de los espermatozoides (Cornwall, 2009), si el varicocele afecta la función de epidídimo, la calidad de los espermatozoides podría verse afectada. El epidídimo se encuentra dentro del escroto, compartiendo las mismas condiciones de los testículos durante el varicocele, como los altos niveles de especies reactivas de oxígeno y la baja capacidad antioxidante total, en comparación con los sujetos sanos (Pasqualotto y col., 2008; Blumer y col., 2008). Estas condiciones pueden perjudicar la maduración de los espermatozoides, manifestándose como pobre motilidad, morfología y calidad de la membrana del espermatozoide. Es importante destacar que en este estudio la concentración de NAG se correlacionó positivamente con un aumento de la morfología normal, la motilidad a + b, la vitalidad y HOST, variables que pueden ser modificados por el almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo.

El HOST evalúa la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides: En condiciones hipo-osmóticas los espermatozoides se “hinchan” debido al influjo de agua y la expansión de las membranas. Jeyendran y col., (Jeyendran y col., 1984) indicaron una buena correlación entre el porcentaje de espermatozoides que en una muestra de semen eran capaces de experimentar hinchazón y el porcentaje de ovocitos de hámster desnudos que fueron penetrados por los espermatozoides capacitados, de la misma muestra de semen. Además, una reciente publicación (Stanger y col., 2010) informó que HOST identifica espermatozoides individuales con una fragmentación de ADN mínima. Adicionalmente, un estudio informó que una disminución de la alfa-glucosidasa neutra se correlaciona con un aumento en el porcentaje de fragmentación del ADN (Watanabe y col., 2009), estos resultados sugieren que HOST, NAG y la fragmentación ADN podrían estar asociados.

En la presente investigación se llevó a cabo estudios de coeficientes de correlación entre los marcadores de las glándulas sexuales accesorias y los parámetros seminales, en el grupo total de hombres evaluados, a fin de determinar si las concentraciones de estos marcadores están relacionadas con la calidad del semen y puede ser vinculado a los

resultados de varicocele. Durante mucho tiempo se ha sugerido que tanto el fluido prostático como el de las vesículas seminales puede afectar la motilidad del espermatozoide. Una investigación indicó una correlación negativa entre el número de espermatozoides móviles y la concentración de fructosa (mg / ml) (Lewis-Jones y col., 1996), mientras que otro estudio muestra lo opuesto (Said y col., 2009) y otro, similar a nuestro estudio, no encontró ninguna asociación (Andrade-Rocha, 1999). Anteriores estudios indican que un marcador de origen prostático, tal como el antígeno prostático específico, mostró una asociación positiva (significativa) con el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides (Elzanaty y col., 2002; Elzanaty, 2007; Carpio y col., 1994). En el presente estudio se observó que un aumento de la concentración de zinc se asoció con un aumento de la motilidad y la concentración espermática, lo que concuerda con estudios previos (Guerin y col., 1986; Mankad y col., 2006). Por otra parte, se encontró un aumento de PMN en el grupo varicocele en comparación con el grupo de control, similar a lo reportado por un estudio previo (Blumer y col., 2008).

En relación con el volumen seminal y los marcadores de glándulas accesorias, los resultados indican que fructosa, zinc y PAP se correlacionan positivamente con el volumen seminal, lo que podría explicar por la importante contribución de podría ser explicado por la sustancial contribución las vesículas seminales y la próstata sustancial al eyaculado final. Sin embargo, NAG no se correlacionó con el volumen del semen, posiblemente porque el epidídimo contribuye menos al volumen total del eyaculado.

En conclusión, el varicocele no altera la secreción de fructosa por las vesículas seminales y la PAP y zinc de origen prostático. El varicocele se asocia con una disminución de la actividad de NAG en el líquido seminal, lo que sugiere disfunción del epidídimo, posiblemente asociado con un efecto perjudicial sobre la calidad espermática. Es necesario realizar nuevas investigaciones para determinar las causas que podrían explicar la disminución de la actividad de NAG en el epidídimo durante el varicocele. Adicionalmente, sería importante determinar si la varicocelectomía conduce a una mejora en la actividad de la actividad NAG.

6-CAPÍTULO III

Selenio y zinc en plasma seminal de hombres con varicocele, relación con los parámetros seminales

6.1-Introducción

El varicocele se define como una dilatación del plexo pampiniforme del cordón espermático y se produce más frecuentemente en el lado izquierdo. El varicocele es una de las causas más comunes de infertilidad masculina. La fisiopatología del varicocele se puede atribuir a muchos factores, tales como la hipertermia, el flujo sanguíneo testicular y cambios en la presión venosa, el reflujo de productos de origen renal / suprarrenal, disfunción hormonal, autoinmunidad, estrés oxidativo y apoptosis (Agarwal y col., 2009; Naughton y col., 2001). En relación con el estrés oxidativo, un estudio reciente (Abd-Elmoaty y col., 2010) mostró que hay niveles de estrés oxidativo significativamente superiores en semen de hombres infértiles con varicocele y niveles disminuidos de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. La varicocelectomía se ha asociado con un aumento de la actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante en plasma seminal, así como con una disminución de la fragmentación del ADN (Hurtado y col., 2007).

El selenio, el cobre y el zinc son oligoelementos presentes en el semen humano, que desempeñan un papel importante en la limpieza de moléculas de especies reactivas de oxígeno, ya que forman parte integral de la Cu/Zn-superóxido dismutasa y la selenio-glutatión peroxidasa (Colagar y col., 2009; Xu y col., 2003). El selenio es esencial para la espermatogénesis normal de los mamíferos y desempeña un papel crítico mediado principalmente por dos selenoproteínas, a saber la peroxidasa fosfolípido hidroperóxido glutatión y selenoproteína (Boitani y Puglisi, 2008). La deficiencia de selenio reduce el tamaño de los testículos, y durante una deficiencia prolongada produce la atrofia del epitelio seminífero (Boitani y Puglisi; 2008) defecto de los espermatozoides durante la espermatogénesis y la maduración en el epidídimo (Olson y col., 2004).

El zinc es un elemento traza esencial para el mantenimiento de las células germinales y la progresión de la espermatogénesis (Yamaguchi y col., 2009). El zinc es necesario para la acción de más de 200 metaloenzimas y juega un papel importante en la organización polimérica de macromoléculas como el ADN y el ARN, la síntesis de proteínas y la división celular (Bedwal y Bahuguna, 1994).

El varicocele se ha asociado con una disminución en los parámetros seminales (Vivas-Acevedo y col., 2010). Por otra parte los niveles de cobre, zinc y selenio en plasma seminal se asocian con la calidad espermática en hombres fértiles e infértiles (Xu y col., 2003; Mankad y col., 2006; Colagar y col., 2009). Sin embargo, hay poca información acerca de la concentración de Se, Cu y Zn en el semen de los pacientes con varicocele y su asociación con los parámetros seminales (Andò y col., 1990).

6.2-Objetivo

El propósito de este estudio fue determinar la concentración de selenio, cobre y zinc en el semen de los pacientes con varicocele y la relación con parámetros seminales.

6.3-Materiales y Métodos

Pacientes

Todos los análisis se llevaron a cabo después de recibir la aprobación del consejo institucional y de que todos los pacientes otorgaran su consentimiento informado. Se realizó un estudio de corte transversal con los pacientes que acudieron para evaluación de infertilidad en la Universidad de Los Andes.

Un total de 67 pacientes consecutivos con varicocele se incluyeron en el estudio (42 de Grado II y 25 Grado III). El varicocele se clasificó clínicamente como de grado I (palpable con la maniobra de Valsalva), grado II (palpable sin maniobra de Valsalva) o grado III (visible a través de la piel del escroto). El diagnóstico de varicocele fue confirmado por eco Doppler. Además, se seleccionaron cuarenta y cuatro (44) hombres sin

varicocele y normozoospermicos como grupo de control. Dos especialistas de infertilidad masculina evaluaron a todos los participantes mediante una historia médica completa, un examen físico y análisis de semen.

Análisis de semen

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia eyaculatoria. El análisis seminal se realizó después de la licuefacción del semen, de acuerdo a los criterios de la OMS (World Health Organization, 2001). Los valores normales de referencia fueron: concentración espermática $\geq 20 \times 10^6$ por mililitro, motilidad (a + b) o progresivos rápidos y lentos $\geq 50\%$ y espermatozoides con formas normales $\geq 30\%$.

La prueba hipoosmótica (HOST) se realizó mezclando 0,1 ml de semen con 1,0 ml de una solución de hipo-osmótica preparada de la siguiente manera: 7,3 g de citrato de sodio y 13,5 g de fructosa y 1000 ml de agua destilada (Jeyendran y col., 1984). La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37 ° C, las muestras de semen fueron examinadas bajo microscopio de contraste de fase a 400x. Doscientos espermatozoides fueron evaluados.

Determinación de Selenio and Zinc en plasma seminal

Todas las mediciones se realizaron con el equipo de mesa “Total Reflection X-ray Fluorescence (TXRF) espectrómetro S2 PICOFOX (Bruker AXS, Madison, WI, EE.UU). Este instrumento está equipado con refrigeración por aire, baja potencia, 50 kV tubo de rayos X, un monocromador de múltiples capas, con un 80% de reflectividad y un líquido libre de nitrógeno XFlash® de Silicon Detector Deriva (SDD) con una resolución de energía <150 eV (Mn K alfa). Reflexión total fluorescencia de rayos X (TXRF) es una técnica de espectrometría multi-elemental. El instrumento utilizado es capaz de detectar aluminio y todos los elementos pesados, con excepción de molibdeno que se utiliza como el ánodo de la excitación del tubo rayos X.

El plasma seminal se mezcló 1:1 con Galio como patrón interno. 10 μ L de fluido mezclado se depositó en portadores de cuarzo pulidos y se secó al aire en una cabina de flujo laminar. Los espectros TXRF fueron obtenidos automáticamente en lotes de 24 muestras con un portador adicional que contiene arsénico utilizado por el espectrómetro para ganancia-corrección. El espectro de ajuste, la medición de intensidad de fluorescencia y la cuantificación multi-elemental se realizaron con el software de Bruker. La sensibilidad de todos los elementos fue relativa a la norma Galio interno utilizado como estándar interno y para la cuantificación de todos los elementos detectados en los espectros. Tanto Se, Cu y Zn, así como las señales de los otros elementos, se integraron y se calcularon por comparación con el patrón interno (Ga).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con SPSS 10,0 software estadístico para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias entre varicocele y el grupo normozoospermico se determinó mediante el uso de la prueba de la t de Student. Además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

6.4-Resultados

La Figura 1 muestra un espectro de TXRF de fluido seminal, se observa patrón interno de Ga (10 mg /mL) y la prominente señal de Zn. El inserto de la figura muestra una porción del espectro en una escala ampliada para visualizar la señal de Se.

La Tabla 1 muestra que no existen diferencias significativas tanto en la edad media y el volumen del semen entre normozoospermicos y el grupo con varicocele. Sin embargo, los porcentajes de los siguientes parámetros seminales fueron estadísticamente superiores (p <0,0001) en los hombres normozoospermicos que en el grupo con varicocele: espermatozoides/ml, morfología espermática normal, porcentaje de motilidad a+b, viabilidad espermática y prueba hipoosmótica.

La Tabla 2 muestra que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y varicocele en los niveles seminales de zinc, sin embargo, la concentración de selenio se redujo en el grupo de varicocele ($p < 0,02$).

La Tabla 3 muestra los estudios de correlación del grupo total (normozoospermicos + varicocele). Se observó una correlación positiva entre las concentraciones de selenio con las siguientes variables: la concentración de espermatozoides, la morfología normal del espermatozoide y el porcentaje de motilidad (a + b). Por otra parte, la concentración de zinc en el líquido seminal se correlacionó positivamente con la concentración de espermatozoides. Además, se presentó una fuerte correlación positiva ($r = 0,68$) entre la concentración de selenio y zinc.

www.bdigital.ula.ve

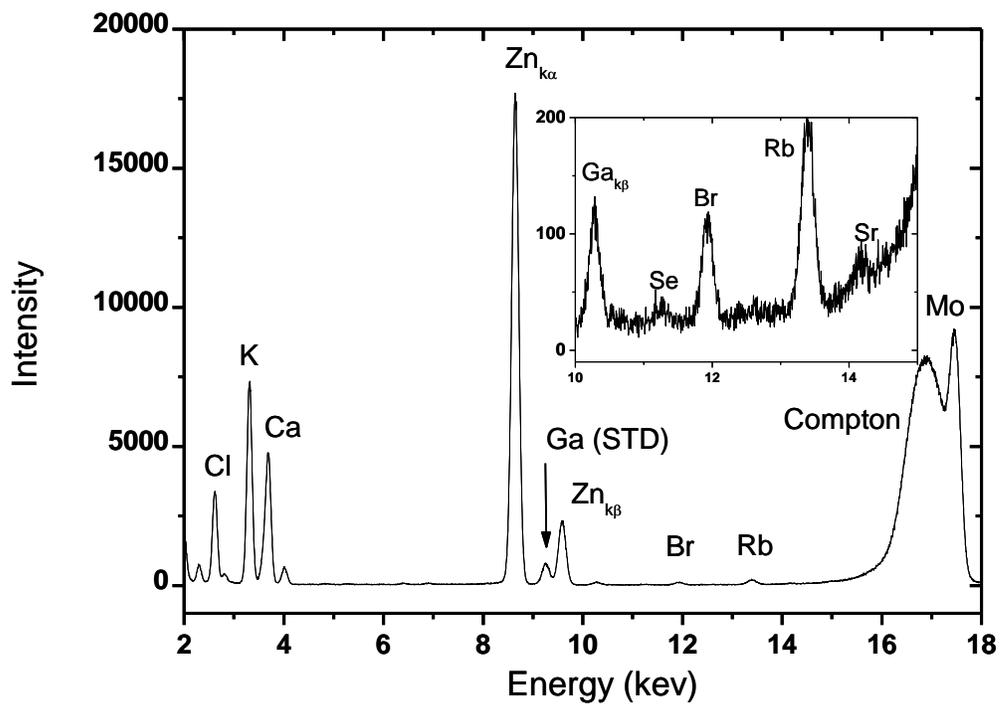


Figura 1. Espectro TXRF del fluido seminal que muestra los 10 mg / L del patrón interno de Ga y la prominente señal de Zn. El inserto muestra el Spectrum en una escala ampliada donde se observa la señal de Se.

Tabla 1 Parámetros seminales en el plasma seminal de hombres normozoospermicos y pacientes con varicocele grade II+III

	Sin varicocele Normozoospermicos (n=44)	Varicocele (Grado II+III) (n=67)	<i>p</i> valor
Edad (años)	34,3 ± 6,4	33,6 ± 9,6	ns
Volumen (mL)	3,7 ± 1,1	3,3 ± 1,5	ns
Contaje espermático (x 10 ⁶ /mL)	74,2 ± 32,5	44,3 ± 34,0	0,0001
Morfología normal (%)	35,1 ± 3,8	22,6 ± 7,0	0,0001
Movilidad a+b (%)	65,6 ± 7,9	33,8 ± 16,0	0,0001
Vitalidad (%)	76,9 ± 4,0	59,5 ± 14,8	0,0001
HOST (%)	63,1 ± 2,2	45,5 ± 14,7	0,0001

Los valores son expresados como la media ± SD. ns=no significativo

HOST: Test hipoosmótico.

Tabla 2 Concentración de Zn y Se, en plasma seminal de hombres normozoospermicos y pacientes con varicocele (grado II+III)

	Sin varicocele Normozoospermicos (n=44)	Varicocele (Grado II+III) (n=67)	<i>p</i> value
Zinc mg/L	160,0 ± 99,4	136,9 ± 76,4	ns
Selenio µg/L	56,1 ± 48,1	38,2 ± 36,4	0,02

Los valores son expresados como la media ± SD. ns=no significativo

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3 Coeficiente de correlación entre la concentración en plasma seminal de Se, Cu y Zn los parámetros seminales, en el grupo total de hombres evaluados (n=111)

Coeficiente de correlación		<i>r</i> Pearson
↑ Se	↑ Concentración espermática/mL	0,43
	↑ Morfología normal espermática	0,23
	↑ Movilidad a+b	0,20
↑ Zn	↑ Concentración espermática/mL	0,26
↑ Se	↑ Zn	0,68

Todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

www.bdigital.ula.ve

6.5-Discussion

En el presente estudio, se determinaron las concentraciones de selenio y zinc en el plasma seminal de hombres sin varicocele y normozoospermicos o con varicocele y se evaluó la relación con los parámetros seminales. La concentración de selenio en los hombres con varicocele fue menor que el grupo normozoospermicos, mientras que no se observaron diferencias con respecto a la concentración de zinc. Se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la concentración de zinc y de selenio en el plasma seminal en el grupo total lo que parece indicar que tanto el zinc como el selenio puede proceder en gran parte de la glándula prostática (Behne y col., 1988; Oldereid y col., 1998).

El selenio del plasma seminal se correlacionó positivamente con un aumento del recuento de espermatozoides, motilidad y morfología normal. Los resultados concuerdan con estudios anteriores (Xu y col., 2003; Akinloye y col., 2005). El selenio puede tener varias funciones en los testículos: primero es el papel estructural en la espermatogénesis y el desarrollo de la pieza intermedia de los espermatozoides (Kehr y col., 2009), segundo en el desarrollo de las células de Sertoli (Marin-Guzman y col., 2000) y tercero como un componente de la enzima selenio-glutación peroxidasa.

La suplementación dietética con selenio produce una disminución significativa en la peroxidación de los lípidos del espermatozoide y una mejora de la motilidad en hombres infértiles (Marin-Guzman y col., 2003). Igualmente, un estudio reciente demostró que el tratamiento de los hombres infértiles con oligo-astenoteratospermia idiopática, con 200 mg. por día de selenio por vía oral, durante 26 semanas, mejora los parámetros del semen (Safarinejad y Safarinejad, 2009).

Por otro lado, es necesario vigilar la dosis del suplemento de selenio, porque tanto la deficiencia de selenio en la dieta así como exceso de la suplementación puede inducir daños en los espermatozoides almacenados en epidídimo de ratón. Así un estudio mostró que los espermatozoides de ratones deficientes de selenio presentaron una condensación de la cromatina incompleta, con un aumento de la incidencia de roturas de cadena de ADN (Shalini y Bansal, 2008). Sin embargo, un aumento significativo en la peroxidación lipídica

se observó tanto en los ratones con deficiencia de selenio como los que lo recibieron en exceso. Además, la expresión de los genes p65 y p50, componentes de NFkappaB, se incrementó en ratones con una dieta deficiente en selenio (Shalini y Bansal, 2007).

En nuestro estudio se observó una correlación positiva significativa entre los niveles de zinc y el recuento de espermatozoides, resultados que concuerdan con estudios anteriores (Chia y col., 2000; Wong y col., 2001; Mankad y col., 2006; Colagar y col., 2009). El Zn es un elemento traza esencial para el mantenimiento de las células germinales, la espermatogénesis, la progresión y la regulación de la motilidad del espermatozoide (Yamaguchi y col., 2009). El Zn puede funcionar como un antioxidante por dos mecanismos. En primer lugar, compite con el Fe y el Cu por la unión a las membranas celulares y algunas proteínas, desplazando a estos metales con alta capacidad redox y haciéndolos más disponibles para la unión a ferritina y metalotioneína, respectivamente. En segundo lugar, el Zn se une a los grupos sulfidrilo de las proteínas, protegiéndolas de la oxidación (Bettger, 1993).

La relación Cu /Zn se ha usado anteriormente como un indicador de estrés oxidativo. Sin embargo, utilizando el equipo TXRF sólo 34,2% de las muestras de plasma seminal tenían niveles detectables de Cu, por lo tanto, la relación de Cu /Zn en muchos de los plasma seminales fue cero. Por esta razón, la relación Cu / Zn no fue incluida en esta investigación.

Un estudio reciente mostró que la elevación de la temperatura escrotal es uno de los principales factores que afecta a la espermatogénesis y la esteroidogénesis en el testículo con varicocele. Se ha demostrado que el estrés por calor está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo, seguido por la apoptosis de las células germinales (Shiraishi y col., 2009). Un estudio en animales experimentales muestra que el calentamiento escrotal provoca una reducción significativa de la motilidad espermática y la concentración, pero, curiosamente los efectos adversos de la hipertermia en los parámetros del semen se puede prevenir por medio de zinc (Ghasemi y col., 2009), lo que sugiere que los pacientes con varicocele pudiesen beneficiarse con el tratamiento con zinc, pero esta proposición debe ser apoyada por otros estudios experimentales.

Una reciente revisión sistemática del efecto de los antioxidantes orales sobre la infertilidad masculina llegó a la conclusión de que el uso oral de antioxidantes (vitaminas C y E, zinc, selenio, ácido fólico, carnitina y carotenoides) en hombres infértiles podría mejorar la calidad espermática y las tasas de embarazo (Ross y col., 2010).

En conclusión la concentración de selenio está disminuida en los pacientes con varicocele. Una disminución de la concentración de selenio se asoció con un recuento bajo de espermatozoides, baja motilidad y morfología normal. Además, un aumento en los niveles de zinc en plasma seminal se asoció con un incremento en la concentración de espermatozoides. Un estudio experimental debe ser llevado a cabo para evaluar los beneficios de los suplementos de zinc y selenio para mejorar los parámetros seminales en pacientes con varicocele. Además, investigaciones futuras deben hacerse para evaluar los niveles seminales de selenio y zinc después de varicolectomía, si se produce un aumento luego de la cirugía que esto podría ser un indicio de que el varicocele se asocia con la disminución de estos elementos traza. Este trabajo demuestra que la utilización del equipo TXRF es una técnica analítica potente y simple para la determinación de las concentraciones de elementos traza en el líquido seminal.

7-Capítulo IV

El varicocele altera los valores de alfa glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico, test hipoosmótico y fragmentación de ADN espermático

7.1-Introducción

La infertilidad es un importante problema que afecta aproximadamente al 13-15% de las parejas en el mundo y se define como la incapacidad de la pareja de concebir luego de un año de relaciones sexuales regulares sin protección (Jarow y col., 2002). De las diferentes condiciones que afectan la fertilidad masculina, tales como infecciones genitourinarias, factores inmunológicos, anomalías genéticas, exposición a tóxicas, desórdenes endocrinos, enfermedades sistémicas y cáncer, el varicocele por si solo abarca el 35% de los casos (Madgar y col., 1995; Agarwal y col., 2012).

El varicocele es una dilatación anormal de las venas del plexo pampiniforme del cordón espermático, la cual se presenta más frecuentemente en el lado izquierdo. El varicocele afecta aproximadamente del 15-20% de los adolescentes de la población mundial, siendo responsable de aproximadamente el 19-41% de los casos de infertilidad primaria y de más del 80% de la infertilidad secundaria (Madgar y col., 1995; Witt y Lipshultz, 1993).

Se ha propuesto que el varicocele puede causar infertilidad en el hombre a través de diferentes mecanismos fisiopatológicos tales como; hipertermia escrotal, hipoxia, desbalance hormonal y reflujo de metabolitos renales y/o adrenales (Agarwal y col., 2012). Estas condiciones pueden provocar un desbalance entre las moléculas que generan estrés oxidativo y las de protección antioxidante (Agarwal y col., 2006, Smith y col., 2006), conllevando al estrés oxidativo, el cual afecta el funcionamiento celular a través de diferentes mecanismos tales como la peroxidación lipídica de la membrana espermática y fragmentación del material nuclear del espermatozoide (Blumer y col., 2012; Blumer y col., 2008; Agarwal y col., 2006).

Varios marcadores han sido empleados para evaluar la fragmentación del ADN (Shamsi y col., 2011), uno de ellos es el test de dispersión de la cromatina (SCD), el cual es una prueba simple y que no requiere de instrumentación compleja. La prueba se basa en someter a los espermatozoides a la remoción de las proteínas nucleares y posteriormente a coloración, así los espermatozoides con ADN intacto se observan al microscopio con un halo alrededor de la cabeza espermática, mientras que si el ADN está fragmentado el halo es inexistente o muy pequeño (Fernández y col., 2003).

Aunque la mayoría de los estudios relacionados con varicocele y fertilidad se enfocan principalmente en el daño al testículo es evidente que dado que el epidídimo es un órgano intraescrotal también puede estar afectado. El epidídimo juega un papel crucial en la maduración espermática, la adquisición de la movilidad progresiva y la capacidad fertilizante (Peña y col., 2001). Es a través del paso de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo donde adquieren la capacidad fértil y la maduración de la membrana plasmática, mediante la modificación de azúcares, proteínas y lípidos (Moore, 1998). Adicionalmente, el núcleo espermático experimenta cambios en la condensación de la cromatina (Golan y col., 1996) con un incremento en los puentes disulfuro del ADN (Said y col., 1999), lo que le confiere mayor estabilidad al material genético. Por otra parte, al comparar los niveles de estrés oxidativo en hombres con o sin vasectomía, se observó que los niveles de peroxidación en semen incrementan con la vasectomía lo que indica que el epidídimo contribuye a la capacidad antioxidante tanto en el semen como en el tránsito y almacenaje de los espermatozoides en este órgano. (Potts y col., 1999).

El epidídimo produce diversas moléculas las cuales se han empleado para evaluar su funcionamiento tales como alfa-glucosidasa neutra y ácida), glicerofosfolina y L-carnitina (Cooper y col., 1988). Uno de los marcadores más utilizados es la enzima alfa glucosidasa neutra (NAG) cuyo origen es casi exclusivamente del epidídimo y puede medirse en el semen, siendo de utilidad para evaluar la disfunción y/o la existencia de obstrucción a nivel del epidídimo (Peña y col., 2004, Kret y col., 1995).

Otro aspecto que se ha visto perjudicado por la presencia del varicocele es la calidad e integridad de la membrana espermática, como lo demuestran dos estudios, uno de ellos mediante la técnica de citometría de flujo (An y col., 2011) y otro mediante fluorometría

(Buffone y col., 2006). Una prueba que se emplea con frecuencia para evaluar la integridad funcional espermática y el potencial fertilizante es el test hipoosmótico (HOST), el cual se fundamenta en la habilidad de la membrana espermática en mantener el equilibrio en un ambiente hipoosmótico (Jeyendran y col., 1984; Ramu y Jeyendran, 2013). Otra ensayo, creado hace ya una década, es el test de unión del espermatozoide al ácido hialurónico (HBA) (Huszar y col., 2003), la cual es utilizada para la evaluación de la madurez de la membrana y se basa en que los espermatozoides que se unen al ácido hialurónico son maduros, han completado la espermatogénesis y han presentado remodelación de la membrana, extrusión de la gota citoplasmática y remplazo nuclear de las histonas por protaminas y adicionalmente no han sufrido la reacción acrosómica.

7.2-Objetivo

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la relación entre el marcador de la función del epidídimo (NAG) con la fragmentación del núcleo espermático (SCD) y la integridad y madurez de la membrana espermática (HOST y HBA) en pacientes con o sin varicocele y determinar la posible correlación entre funcionalidad del epidídimo, con las pruebas antes mencionadas y los parámetros seminales.

7.3-Materiales y Métodos

Grupo de estudio

Los pacientes incluidos en esta investigación cumplieron con las siguientes condiciones: llenar formulario de consentimiento informado (Anexo 9.1), no poseer antecedentes de enfermedades sistémicas, ni antecedentes o presencia de infecciones generales, genitales o urinarias, atrofia testicular, epididimitis, criptorquidia; o ingesta de medicamentos o drogas. Adicionalmente, el grupo denominado “control” estuvo conformado por hombres sin varicocele y normozoospermicos.

Análisis seminal:

Cada paciente recolectó una muestra de semen, mediante masturbación luego de una abstinencia sexual de entre 2 y 5 días. La muestra fue recolectada en un recipiente plástico de boca ancha en el cuarto de toma de muestra de nuestro CEDIEG y entregada al personal del mismo. Seguidamente, los pacientes completaron la encuesta preparada para la investigación. Las muestras de semen se procesaron inmediatamente después de su recepción y posterior a la licuefacción y siguiendo las normas de la OMS (WHO, 2010).

Espermograma:

El espermograma básico incluyó el análisis macroscópico, microscópico como se indica abajo. Entre paréntesis aparecen los valores de referencia (WHO, 2010).

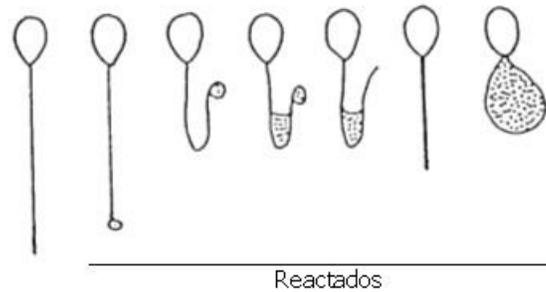
Examen macroscópico: Licuefacción (<60 min), volumen (1,4-1,7 mL), color (blanquecino o grisáceo), aspecto (homogéneo o opalescente), viscosidad (gota a gota \leq 2cm), pH (/7,2).

Examen microscópico: Concentración ($\geq 15 \times 10^6$ /mL o $> 39 \times 10^6$ /eyaculado), movilidad (Progresivos+no progresivos/40%; progresivos>32%), viabilidad (>58%), morfología espermática (normales /4%), Test hipoosmótico (HOST) (/58%) y leucocitos (< 1×10^6).

Test hipoosmótico (HOST)

Este test hipoosmótico (hypo-osmotic swelling test o HOST) evalúa el estado funcional de la membrana plasmática y la viabilidad. La prueba consiste en colocar los espermatozoides en una solución hipoosmótica. Los espermatozoides con membranas normales van a ser capaces de incorporar agua e hincharse (swell) a nivel de la cola. El estudio de la integridad de la membrana del espermatozoide se realizó mediante la mezcla de 0,1 ml de semen con 1,0 ml de una solución hipoosmótica. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37 °C y se observaron al microscopio de contraste de fases a 400x. Se evaluaron doscientos espermatozoides y se determinó cuáles presentaban cola hinchada y cuáles no. La hinchazón se identificó por cambios en la conformación de la cola. La solución hipoosmótica se preparó de la siguiente manera: Se disolvieron 7,3 gr de citrato de

sodio y 13.5 g de fructosa en 1000 ml de agua destilada (Jeyendran y col., 1984; WHO, 2010). El patrón de hinchamiento de los espermatozoides se presenta en la siguiente figura.



Leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Los PMN se evaluaron mediante la tinción de mieloperoxidasa: El procedimiento empleado fue el siguiente: 20 μ L de muestra de semen se colocó en 1 ml de solución de trabajo. Se realizó el recuento de 200 células peroxidasa-positivas (teñidas de color café) y células peroxidasa-negativa (incoloras), en hemocitómetro usando un microscopio de contraste de fase a 400x. La solución de trabajo se preparó mezclando 2 ml de solución salina de tampón fosfato (pH 7,0) y 4 ml de solución de bencidina (0,0125% p/v con 0,0375% de H_2O_2) (WHO, 2010).

Alfa glucosidasa neutra (NAG):

La concentración de α -glucosidasa neutra en plasma seminal se determinó por el método fotométrico descrito previamente (Cooper y col., 1990). El sustrato PNFG (p-nitrofenol- α -glucopiranosido) es hidrolizado por la α -glucosidasa en p-nitrofenol, durante 2 horas a 37°C y pH 6,8. La concentración de p-nitrofenol se determina en un espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda. La unidad internacional (UI) de actividad glucosidasa se define como la producción de 1 mol de p-nitrofenol por minuto a 37 ° C y pH 6,8. El valor de referencia es >20mU/eyaculado. (Valores de referencia 20 mU/eyaculado) (WHO, 2010).

Unión al ácido hialurónico (HBA):

El ensayo de unión del espermatozoide al ácido hialurónico (Hyaluronan Binding Assay, HBA) se realizó con el Kit de la casa comercial Biocoat (Fort Washington, PA, USA), y siguiendo el procedimiento correspondiente. En general, 10 μ l de semen se colocaron en la cámara provista por el fabricante y se cubrió con la lámina. Después de una incubación de 15 minutos en cámara húmeda, se contaron los espermatozoides con motilidad y cabeza unida al ácido hialurónico y los móviles sin cabeza unida. El porcentaje de espermatozoides unidos al ácido hialurónico (HBA) se calculó dividiendo los espermatozoides móviles y unidos entre el total de espermatozoides contados y se multiplicó por 100 (Ye y col., 2006). (Valores de referencia > de 80%)



Dispersión de la cromatina espermática (SCD)

La dispersión de la cromatina espermática (Sperm Chromatin Dispersion test, SCD) se determinó empleando el estuche Halosperm (Halosperm® kit, INDAS laboratories, Spain) (Fernández y col., 2003) (INDAS), siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. En general, una alícuota de semen se diluyó a una concentración de 10×10^6 /mL en Buffer Fosfato-Salino (PBS). La agarosa, provista en el kit en tubos eppendorf se fundió en baño de María a 90-100° C por 5 minutos y luego, para equilibrar, a 37° C por 5 minutos. 60 μ L de la muestra diluida se colocaron en la agarosa y se mezcló. 20 μ L de la mezcla se colocaron en lámina cubreobjeto y se cubrió con una laminilla. Para la gelificación, la lámina se incubó durante 5 min. a 4° C, se retiró la laminilla. La lámina se colocó en posición horizontal se cubrió con Ácido Clorhídrico diluido (80 μ L de HCL en 10 ml de agua destilada), se incubó por 7 minutos, se retiró el HCL. La lámina se cubrió con Lisina durante 25 minutos y luego se lavó con agua destilada. Posteriormente, las

láminas se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70%, 90%, y 100%) durante 2 minutos en cada uno, se dejan secar al aire. Finalmente, las láminas se colorearon con una solución de Wright (Merck 1.01383.0500) y PBS (Merck1.07294.1000) en proporción 1:1, durante 5 minutos, las láminas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. (Valores de referencia: < 30%).

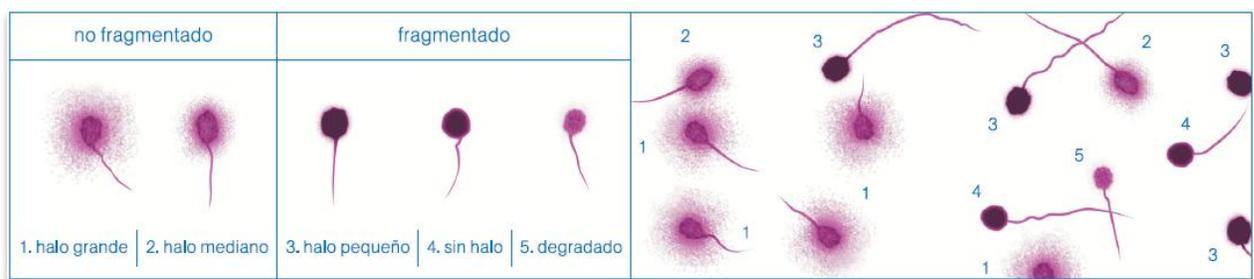
Empleando un microscopio convencional y objetivo 100x, se realizó la medición de los halos. Para ello, se comparó el ancho del halo de dispersión de la cromatina con el diámetro del núcleo del espermatozoide. Los criterios de dispersión de la cromatina fueron los siguientes (Fernández y col. 2003):

1) No fragmentados:

- Espermatozoides con halo grande (halo similar o mayor que el diámetro menor del núcleo).
- Espermatozoides con halo mediano (entre halo grande y halo muy pequeño).

2) Fragmentado:

- Espermatozoides con halo muy pequeño.
- Espermatozoides sin halo.
- Espermatozoides sin halo y degradado, similar a 4 pero imperceptible o sin colorear.



Estadística

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 10,0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias entre los dos grupos con una distribución normal se determinaron mediante el uso de la prueba de t de

Student y se realizó el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

7.4-Resultados

La relación entre los parámetros seminales el marcador de epidídimo alfa glucosidasa neutra y el test de unión al ácido hialurónico en el grupo de hombres control y con varicocele se presenta en la Tabla 1. Puede observarse que no se presentó diferencia en la edad entre los grupos control y varicocele. En cuanto a los parámetros seminales evaluados en el espermograma estándar los pacientes con varicocele (II+III) presentaron valores inferiores a los controles (todos estadísticamente significativos) en volumen, concentración espermática, movilidad, viabilidad, morfología normal y test hiposmótico. Por otra parte los pacientes con varicocele mostraron valores superiores de pH y de leucocitos polimorfonucleares. El marcador de epidídimo alfa glucosidasa neutra en los hombres con varicocele presentó valores muy inferiores al grupo control, lo cual fue estadísticamente significativo. Adicionalmente la prueba de evaluación de madurez de la membrana plasmática el test unión al ácido hialurónico (HBA) estuvo disminuido significativamente en el grupo con varicocele en relación al control.

En la Tabla 2 se presentan la comparación de los resultados de la fragmentación de ADN espermático evaluado mediante el test de SDC (Halosperm) en pacientes normozoospermicos (control) y con varicocele. Se muestran dos categorías “no fragmentado total” la cual resulta de la suma de las categorías halo grande y halo mediano; además está la categoría índice de fragmentación SCD, que es la suma de las categorías halo pequeño, sin halo y degradado, como se explicó en materiales y métodos. Puede observarse que en todas las categorías de SCD evaluadas se presentó un incremento estadísticamente significativo de la fragmentación del ADN en el grupo con varicocele. El índice de fragmentación del ADN fue de 13,3% en el grupo control mientras que en el grupo con varicocele fue de 36,2%. Llama la atención que la fragmentación observada en el grupo control es principalmente la de “halo pequeño”, seguida por “sin halo” y finalmente

“degradado”, mientras que en el grupo con varicocele se observa un porcentaje similar de fragmentación en estas tres categorías. Al evaluar los diferentes patrones de espermatozoides con ADN fragmentado dentro del grupo total de espermatozoides con ADN degradado se encontró que la relación de células fragmentado/degradado es de 3,0 ($36,2/12,0=3,0$) en el grupo con varicocele mientras que fue de 8,7 en pacientes normozoospermicos ($13,3/1,5=8,7$).

Para determinar la correlación entre los parámetros seminales, el marcador de epidídimo alfa glucosidasa neutra, el test de unión al ácido hialurónico y el índice de fragmentación del ADN se incluyeron tanto a los hombres normozoospermicos como con varicocele ($n=90$). Se utilizó el test de correlación de Pearson y los resultados se presentan en la Tabla 3. Se observa que al incrementar los niveles del marcador de epidídimo NAG incrementa la calidad de los parámetros seminales (volumen, concentración espermática, morfología normal, movilidad, viabilidad, test hipoosmótico) y la madurez de la membrana espermática evaluada por HBA. Por otra parte NAG se correlacionó negativamente con pH, leucocitos polimorfonucleares y el índice de fragmentación SCD.

En cuanto al HBA estuvo correlacionado positivamente con algunos parámetros seminales (morfología normal, movilidad, viabilidad, test hipoosmótico) pero no con otros (volumen y concentración espermática). Al igual que para la prueba de NAG, hubo una correlación negativa entre HBA con pH, leucocitos polimorfonucleares y el índice de fragmentación SCD. Al evaluar los resultados de correlación del índice de fragmentación del ADN (% SCD) se observa que estuvo correlacionado negativamente con todos los parámetros evaluados con excepción del pH.

Cabe destacar que NAG presentó una correlación negativa muy marcada con el índice de fragmentación del ADN (Pearson $r=-0.70$). Otro resultado importante fue la correlación positiva entre el índice SCD con el porcentaje de polimorfonucleares ($r=0.69$) y negativa con HOST ($r=-0,64$). La prueba de HBA, aunque mostró correlación con los parámetros seminales los valores de r ($0,22-0,46$) siempre fueron inferiores a las pruebas NAG y SCD.

Tabla 1

Parámetros seminales, alfa glucosidasa neutra y test de unión al ácido hialurónico de hombres control o con varicocele

Variable	Control n=30	Varicocele (II+III) n=60	p
Edad (años)	31,4 ± 4,4	29,1 ± 6,4	ns
Volumen (mL)	3,7 ± 0,9	2,6 ± 1,0	0,0001
pH	7,5 ± 0,1	7,8 ± 0,2	0,0001
Espermatozoides x10 ⁶ /mL	78,7 ± 21,7	62,9 ± 37,5	0,0006
Espermatozoides x10 ⁶ /eyaculado	290,5 ± 104,7	167,9 ± 133,6	0,03
Movilidad a (%)	31,8 ± 4,1	20,3 ± 9,3	0,0001
Movilidad a+b (%)	67,4 ± 5,8	46,2 ± 13,4	0,0001
Vivos (%)	75,9 ± 2,7	70,2 ± 6,8	0,0001
Morfología normal (%)	36,3 ± 3,1	25,9 ± 8,2	0,0001
Morfología Kruger (%)	12,1 ± 1,0	8,6 ± 2,7	0,0001
PMN x10 ⁶ /eyaculado	0,4 ± 0,2	1,7 ± 0,7	0,0001
HOST (%)	65,5 ± 9	47,8 ± 11,0	0,0001
NAG (mUI/eyaculado)	32,1 ± 7,7	14,1 ± 7,1	0,0001
HBA (%)	79,8 ± 7,5	65,1 ± 22,6	0,0001

Los valores se expresan como media ± SD.

PMN: Leucocitos polimorfonucleares; HOST: Test hipoosmótico; NAG: alfa glucosidasa neutra; HBA: Test de unión al ácido hialurónico.

El grupo denominado “Control” estuvo conformado por hombres sin varicocele y normozoospermicos.

Tabla 2

Comparación de la fragmentación del ADN espermático entre controles y pacientes con varicocele.

Fragmentación del ADN espermático (SCD)	Control n=30	Varicocele (II+III) n=60	<i>p</i> valor
No fragmentado total (%)	86,7± 4,3	63,8 ± 3,8	0,0001
Halo Grande	73,6 ± 4,9	54,4 ± 3,3	0,0001
Halo Mediano	13,1 ± 3,4	9,4 ± 2,9	0,0001
Índice de fragmentación SCD (%)	13,3 ± 4,2	36,2 ± 3,8	0,0001
Halo Pequeño	8,0 ± 3,1	12,1 ± 2,8	0,0001
Sin Halo	3,8 ± 2,0	12,1 ± 2,7	0,0001
Degradado	1,5 ± 0,9	12,0 ± 4,6	0,0001

Se utilizó el estuche Halosperm, el cual que permite evaluar la dispersión de la cromatina espermática (SCD) en los diferentes patrones mostrados en la tabla.

El grupo denominado “Control” estuvo conformado por hombres sin varicocele y normozoospermicos.

Tabla 3

Correlación entre parámetros seminales, alfa glucosidasa neutra, test de unión al ácido hialurónico e índice de fragmentación del ADN en el total de los hombres evaluados en este estudio

	Estudio de correlación	r Pearson
↑ NAG (mUI/ eyaculado)	↓ pH ↑ Volumen (mL) ↑ Concentración espermática x10 ⁶ /eyaculado ↑ Morfología espermática (Kruger %) ↑ Movilidad a+b (%) ↑ Espermatozoides vivos (%)	-0,44 0,78 0,61 0,53 0,49 0,35
	↓ PMN/eyaculado ↑ % HOST ↑ % HBA ↓ Índice de fragmentación SDD (%)	-0,56 0,58 0,26 -0,70
↑HBA (%)	↓ pH Volumen (mL) Concentración espermática x10 ⁶ /eyaculado ↑ Morfología espermática (Kruger %) ↑ Movilidad a+b (%) ↑ Espermatozoides vivos (%)	-0,46 ns ns 0,38 0,34 0,41
	↓ PMN/eyaculado ↑ HOST (%) ↑ NAG (mUI/ eyaculado) ↓ Índice de fragmentación SDD (%)	-0,22 0,31 0,26 -0,30
↑Índice de fragmentación SDF (%)	↑ pH ↓ Volumen ↓ Concentración espermática x10 ⁶ /eyaculado ↓ Morfología espermática (Kruger %) ↓ Movilidad a+b (%) ↓ Espermatozoides vivos (%)	0,42 -0,41 -0,40 -0,54 -0,64 -0,40
	↑ PMN/eyaculado ↓ HOST (%) ↓ HBA (%) ↓ NAG (mUI/ eyaculado)	0,69 -0,64 -0,30 -0,70

Se incluyeron en este estudio de correlación de Pearson tanto a los hombres control como con varicocele (n=90).

PMN: leucocitos polimorfonucleares; HOST: Test hipoosmótico; NAG: alfa glucosidasa neutra; HBA: Test de unión al ácido hialurónico.

7.5-Discusión

En la presente investigación se evaluó en pacientes con varicocele la relación entre el marcador de epidídimo, alfa glucosidasa neutra, con el nivel de fragmentación de ADN, evaluado por SCD y la calidad de la membrana plasmática, valorada por la unión al ácido hialurónico y el test hipoosmótico. Los resultados demuestran que el epidídimo presenta una hipofunción durante el varicocele lo que se asocia a una disminución de la calidad de la membrana y el núcleo espermático.

El epidídimo es un importante órgano involucrado en la maduración espermática que comprende tres segmentos, cabeza, cuerpo y cauda. En los tres segmentos se localizan “células principales” metabólicamente activas que tienen la capacidad de producir moléculas reactivas al oxígeno (ROS) así como antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa tipo 5 y glutatión transferasa) y no enzimáticos (glutatión y taurina) (Castellón y col, 2005). La generación de antioxidantes del epidídimo es esencial para contrarrestar los eventos dañinos resultantes de excesiva producción ROS tanto localmente como transportados desde el testículo (Agarwal y col., 2012).

Está demostrado que la fisiología del epidídimo es regulada por andrógenos testiculares y factores luminales provenientes del testículo, rete testis y conductillo eferentes (Turner y Riley, 1999), como también factores externos ambientales como infecciones y temperatura, entre otros. Es posible que los productos de secreción como citocinas y radicales libres liberados por un testículo varicoso sean factores que afecten negativamente la función secretora epididimaria. Por otra parte, se ha observado un incremento de la apoptosis en el epidídimo en ratas castradas, la cual fue mayor a nivel de la cabeza que en las regiones proximales de este órgano (Fan y Robaire, 1998) y parece estar relacionada con las secreciones provenientes del testículo, retetestis y tubos rectos, las cuales tienen mayor contacto con las regiones proximales (Turner y Riley, 1999). Adicionalmente, se han identificados seis factores lumicrinos que tienen actividad antiapoptótica cuyos receptores se localizan específicamente en las células epiteliales de la cabeza del epidídimo (Wade y col., 2002).

El marcador de epidídimo alfa glucosidasa neutra está ausente en el semen de pacientes con azospermia y con completa obstrucción en el tracto reproductor, lo que indica que esta enzima proviene exclusivamente del epidídimo, principalmente de la cabeza y cuerpo de este órgano (Cooper y col., 1990). Un estudio mostró que los niveles de NAG están disminuidos en el plasma seminal de pacientes con oligozoospermia o con disfunción epididimal, posiblemente por el efecto que ejerce la disminución de testosterona de origen testicular durante el varicocele (Cooper y col., 1988), hormona necesaria para el correcto funcionamiento del epidídimo (Mahmoud y col., 1998), como lo demuestra un estudio donde la castración en rata disminuyó la actividad de NAG luego de siete días de la intervención quirúrgica (Kalla y col., 1997). Estudios previos muestran que la actividad de NAG se correlaciona positivamente con los parámetros seminales tradicionales (Mahmoud y col., 1998; Cooper y col., 1988; Vivas-Acevedo y col., 2010 y 2011), al igual que lo encontrado por nuestra investigación, lo que sugiere que una secreción normal de este marcador de epidídimo está asociada a buena calidad seminal.

El modelo en rata ha sido utilizado para evaluar el efecto del varicocele experimental (Zhang y col., 2003), usando este modelo se ha demostrado que el epidídimo se ve muy afectado por el varicocele, observándose disminución del peso, diámetro tubular, con aumento en alteraciones morfológicas de las células principales y los niveles de apoptosis, daño que fue proporcional a la duración del varicocele (Zhao y col., 2006, Ozturk y col., 2008). Otro hallazgo importante es que el varicocele experimental en rata provoca un incremento en el factor de hipoxia (HIF-alfa) el cual se correlacionó negativamente con la funcionalidad del epidídimo (Wang y col., 2008). Adicionalmente se observa una disminución de la producción de carnitina (un antioxidante) y NAG en todos los segmentos del epidídimo (Zhao y col., 2003).

Por otra parte, la disminución de la concentración de NAG en semen humano se ha asociado significativamente con un incremento de la fragmentación del ADN (Watanabe y col., 2009), resultados que están acordes con los hallados por nosotros en el presente trabajo, con una correlación entre NAG y SCD de un valor de $r=-0,70$, el más elevado observado en nuestra investigación. Una de las enzimas antioxidantes más importantes producidas por el epidídimo humano (cuerpo y cauda) es la glutatión peroxidasa (Castellón

y col., 2005), es posible que el daño a nivel del epidídimo, reflejado por la disminución de la NAG, se vea expresado por una disminución de la producción de glutatión peroxidasa y un incremento de producción de ROS.

Los pacientes con varicocele tienen un incremento significativo de daño al ADN, relacionado con un incremento del estrés oxidativo y una reducción de la actividad mitocondrial e integridad acrosómica (Saleh y col., 2003; Blumer y col., 2008). Sakkas y Alvarez (2010) indican que son varios los mecanismos que pueden provocar daño al ADN nuclear y mitocondrial, sin embargo el la principal fuente de fragmentación del ADN es post-testicular, durante el transporte a través del epidídimo. Esta afirmación se basa en investigaciones previas que demuestran que la fragmentación de ADN es mayor en espermatozoides del cauda del epidídimo y en el eyaculado, comparado con los del testículo (Greco y col., 2005; Ollero y col., 2001). La hipoxia y el estrés térmico (Wang y col., 2008; Shiraishi y col., 2013) durante el varicocele podrían provocar un incremento de producción de ROS por las células principales, provocando daño a las células del epidídimo y a los espermatozoides en proceso de maduración contenidos en él (Agarwal y col., 2012).

Una fuente importante de estrés oxidativo son los leucocitos polimorfonucleares. Los pacientes con varicocele presentan mayor número de leucocitos en semen que los hombres normozospermicos, como se observó en el presente trabajo y en trabajos previos (Vivas-Acevedo y col., 2010 y 2011; Blumer y col., 2008). El incremento de PMN en semen puede aumentar la generación de estrés oxidativo y sobrepasar la capacidad antioxidante, con un incremento en la fragmentación del ADN y peroxidación de la membrana plasmática (Simbini y col., 1998). En el presente trabajo la concentración de PMN en semen se correlacionó negativamente con la concentración de NAG ($r=-0,56$), lo que está en concordancia con trabajos previos (Mahmoud y col., 1998; Vivas-Acevedo y col., 2010 y 2011) y positivamente con el índice de fragmentación del ADN ($r=0,69$), lo que indica que la presencia de PMN se asocia a una hipofunción epididimaria y a la fragmentación del ADN. El origen de los leucocitos presentes en semen ha sido motivo de discusión por mucho tiempo, sin embargo se cree provienen principalmente del epidídimo y de la próstata (Blumer y col., 2008).

Llama la atención que al detallar los patrones de integridad del ADN dentro del grupo total de espermatozoides con ADN fragmentado, se observó que dentro del grupo de espermatozoides fragmentados, la categoría degradado estuvo en una proporción de 1 a 3 en los pacientes con varicocele, mientras que fue de 1 a 8,7, en los normozospermicos, resultados similares a los encontrados en un estudio previo (Enciso y col., 2006). El incremento de la proporción de ADN degradado (dentro de la categoría fragmentado) en el grupo con varicocele puede indicar que el grado de afectación del núcleo espermático es tan marcado que involucra daños a la matriz proteica nuclear. La degradación del núcleo espermático pudiera ser ocasionada con una compactación deficiente del núcleo espermático en pacientes con varicocele (Talebi y col., 2008) y entonces sea más susceptible a los agentes peroxidantes, esta hipótesis se refuerza por un trabajo reciente que indica una mejoría de la integridad y compactación de la cromatina espermática posterior a la varicocelectomía (Zini y col., 2011).

El test hipoosmótico evalúa la integridad funcional de la membrana plasmática y también es un marcador útil del potencial de fertilidad (Ramu y Jeyendran, 2013). En el presente estudio se observó una correlación inversa y altamente significativa ($r = -0,69$) entre HOST y el test de dispersión de la cromatina, lo que indica que HOST puede aportar información sobre la calidad nuclear, estos resultados concuerdan con una publicación reciente donde se indica que los espermatozoides con patrones de HOST grado D, E y F (los más hinchados), fueron los que presentaron menor fragmentación del ADN, evaluado por TUNEL y SCD (Stanger y col., 2010).

Otra prueba utilizada para evaluar la calidad de la membrana espermática es la unión al ácido hialurónico la cual une a los espermatozoides que presentan menor fragmentación del ADN, mejor integridad del ADN, mejor morfología, menor frecuencia de aneuploidías y mejor unión a la zona pelúcida (Yagci y col., 2010; Huszar et al, 2003; Liu and Baker, 2007; Prinosilova y col., 2009). Las hialuronidasas son una familia de enzimas que catalizan la degradación del ácido hialurónico, abundante en la matriz extracelular, las evidencias indican que pueden tener funciones diversas durante la fecundación, enzimáticas y no enzimáticas, tales penetración del cúmulo, unión a la zona pelúcida y como receptor al ácido hialurónico (Martin-Deleon, 2011). Algunas

hialuronidasas han sido descritas en el espermatozoide (Kimura y col., 2009) como la SPAM1 (o PH-20), la cual se ha propuesto es captada por el espermatozoide en el paso por el testículo y el epidídimo (Chen y col., 2006) se ha asociado con la capacidad de penetrar la matriz de cúmulo ovocitario (Kimura y col., 2009). En el presente estudio se observó en los pacientes con varicocele una disminución en el porcentaje de espermatozoides unidos al ácido hialurónico, lo que indica disminución de las hialuronidasas espermáticas, lo que sugiere la menor capacidad de penetrar el cúmulo y realizar la fecundación. Adicionalmente nosotros encontramos que una correlación positiva de HBA con NAG y una correlación negativa entre HBA y SCD, indicando que la disminución de las hialuronidasas está correlacionada con un incremento en la fragmentación del ADN ($r=-0,30$), como lo muestran trabajos previos (Yagci y col., 2010), sin embargo esta correlación fue muy inferior a la observada entre HOST y SCD ($r=-0,64$). Al igual que otras investigaciones nosotros encontramos una correlación positiva entre HBA y los parámetros seminales (Huszar y col., 2003).

En resumen se encontró que en los pacientes con varicocele los niveles de NAG y la unión al ácido hialurónico estuvieron disminuidos en relación al control, mientras que los niveles de fragmentación del ADN estuvieron mucho más elevados. Adicionalmente, los estudios de correlación en el grupo total de pacientes mostró una fuerte correlación negativa entre disminución de los niveles de NAG e incremento de la fragmentación del ADN y una correlación positiva entre NAG y HBA, de menor magnitud. Estos resultados indican que la disminución del potencial fértil en pacientes con varicocele puede ser la consecuencia no solo de daños a nivel del testículo sino también del epidídimo, reflejado por la disminución de NAG, los que resultan en la disminución de la calidad de los parámetros seminal, disminución de calidad de la membrana y el núcleo espermático.

8- REFERENCIAS

1. Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A. Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2010;94:1531-1534
2. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, Marmar JL. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology* 2007;70:532-8.
3. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol*. 2012;9:678-90.
4. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:630-3.
5. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and ADN damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331– 45.
6. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009;73:461-9.
7. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009;73:461-9.
8. Akinloye O, Arowojolu AO, Shittu OB, Adejuwon CA, Osotimehin B. Selenium status of idiopathic infertile Nigerian males. *Biol Trace Elem Res* 2005;104:9-18.
9. Alvarez J, Sharma R, Ollero M, Saleh R, Lopez M, Thomas A, Evenson D, Agarwal A. Increased ADN damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2002;78:319-329.
10. An LM, Ma JH, Li WW, Xia XY, Huang YF, Wang WB. Flow cytometry for evaluation of sperm plasma membrane integrity in varicocele patients *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2011;17:984-8.
11. Andò S, Carpino A, Buffone M, Maggiolini M, Giacchetto C, Seidita. Fructose, prostatic acid phosphatase and zinc levels in the seminal plasma of varicoceles. *Int J Fertil* 1990;35:249-52.

12. Andolz P, Bielsa MA. Semen humano. Manual y Atlas. 1ra ed. Madrid: Editorial Garsi SA;1995
13. Andrade-Rocha FT. Seminal fructose levels in male infertility: relationship with sperm characteristics. *Int Urol Nephrol* 1999;31:107-11.
14. Andrade-Rocha FT. Significance of sperm characteristics in the evaluation of adolescents, adults and older men with varicocele. *J Postgrad Med* 2007;53:8-13.
15. Arrau J, Roblero L, Cury M. New observations on the onset and duration of the meiotic prophase in the female golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Anat.* 1981;132:627-33.
16. Baker H, Burger H, de Kretser D. Testicular vein ligation and fertility in men with varicoceles. *Br Med J* 1985;291:1678-1680.
17. Barroso G, Morshedi M, Oehringer S. Analysis of ADN fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000;15:1338-1344.
18. Baserga R. Molecular biology of the cell cycle. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986;49:219-26.
19. Bedford J., Calvin B. Changes in S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observation in sub mammalian species. *J. Exp. Zool.* 1974;187:181-204.
20. Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 1994;50:626-40.
21. Behne D, Gessner H, Wolters G, Brotherton J. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. *Int J Androl* 1988;11:415-23.
22. Bettger WJ. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidation. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;7:721-4.
23. Bharadwaj A, Ghosh I, Sengupta A, Cooper T, Weinbauer GF, Brinkworth MH, et al. Stage-specific expression of proprotein form of hyaluronan binding protein 1 (HABP1) during spermatogenesis in rat. *Mol Reprod Dev* 2002;62:223-232.
24. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear ADN fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 2008;90:1716-1722.

25. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int.* 2012;109:259-65.
26. Boitani C, Puglisi R. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv Exp Med Biol* 2008;636:65-73.
27. Buffone MG, Brugo-Olmedo S, Calamera JC, Verstraeten SV, Urrutia F, Grippo L, Corbetta JP, Doncel GF. Decreased protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1591-9.
28. Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon J, Hochereau-de-Reviere M, Holstein A. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia.* 1975;7:141-63.
29. Camejo MI, Abdala L, Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Angeli-Greaves M, Greaves ED. Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143:1247-54.
30. Carpino A, Sisci D, Aquila S, Salerno M, Siciliano L, Sessa M, Andò S. Adnexal gland secretion markers in unexplained asthenozoospermia. *Arch Androl* 1994;32:37-43.
31. Caruso A, Walsh R, Ross L. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J. Urol.* 1999;161:280-285.
32. Casano R, Orlando C, Caldini AL, Barni T, Natali A, Serio M. Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha-1,4-glucosidase and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligospermic patients. *Fertil Steril* 1987;47:324-328.
33. Castellón E, Rioseco H, Rojas J, Royer M, Salas E, Contreras H, Huidobro C. Glutathione peroxidase activity in cell cultures from different regions of human epididymis. *Asian J Androl.* 2005;7:33-7.
34. Chakraborty J, Sinha H, Jbunjhunwala J. Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of man with varicocele. *J Androl.* 1985;6:117-126.
35. Chehval M, Purcell M. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril.* 1992;57:174-177.

36. Chen C, Lee S, Chen D, Chien H, Chen I, Chu Y, Liu J, Chen W, Wu G. Apoptosis and Kinematics of Ejaculated Spermatozoa in patients With Varicocele. *J Androl.* 2004;25:348-353.
37. Chen H, Griffiths G, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biol Reprod.* 2006;74:923-30.
38. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 2000; 21:53-7.
39. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52:198-236.
40. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril.* 1966;17:705-21.
41. Cockett A, Takiliara E, Constantino M. The varicocele. *Fertil. Steril.* 1984;41:5-11.
42. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007;33:603-21.
43. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res* 2009; 29:82-8.
44. Colpi G, Negri L, Scropo F, Grugnetti C, Patrizio P. Seminal tract washout: a new diagnostic tool in complicated cases of male infertility. *J Androl.* 1994;15:17-22.
45. Comhaire F, Kunnun M. Selective retrograde venography of the internal spermatic vein: a conclusive approach to the diagnosis of Varicocele. *Androl.* 1976;8:11-24.
46. Comhaire F, Mahmoud A, Depuydt C, Zalata A, Christofer A. Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's view point. *Hum. Reprod.* 1999;5:393-398.
47. Comhaire F, Monteyne R, Kunnun M. Radiology anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int. J. Androl.* 1981;4:379-387.
48. Cooper TG, Jockenhövel F, Nieschlag E. Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod* 1991;6:859-866.

49. Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 1990;13:329-36
50. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Nieschlag E. Epididymal markers in human infertility. *J Androl*. 1988;9:91-101.
51. Cooper TG. Secretory proteins from the epididymis and their clinical relevance. *Andrologia*. 1990;22 Suppl 1:155-65.
52. Cooper TG. The epididymis, sperm maturation and fertilisation. Heidelberg: Springer Verlag, 1986.
53. Cooper TV, Yeung CH, Nashan D. Epididymal Markers in Human Infertility. *Journal of Andrology*;1988;9:91-101
54. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;15:213-27.
55. Correa, J.R. & Zavos, P.M. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen –thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 1994;42:361-370.
56. Court M. The male in farm animal Reproduction. Edit. Institut National de la Recherche Agronomique. France. 1984. p. 79-101.
57. Dahl E, Harrick L. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1959;1:697-705.
58. de Kretser D. Local regulation of testicular function. *Int Rev Cytol*. 1987;109:89-112
59. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368-78.
60. Dubin L, Amelar R. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil. Steril*. 1970;21:606-609.
61. Dym M, Fawcett D. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod*. 1971;4:195-215.
62. Eddy E., Vermon R. Muller C. Hahnel A. Fenderson B. Immunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation. *Am J Anat* 1985;174:225-237.

63. Eliasson R, Virji N. LDH-C4 in human seminal plasma and its relationship to testicular function. II. Clinical aspects. *Int J Androl.* 1985;8:201-14.
64. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002;17:2904-11.
65. Elzanaty S. Association between age and epididymal and accessory sex gland function and their relation to sperm motility. *Arch Androl* 2007;53:149-56.
66. 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;27:106-11.
67. Endtz AW. A rapid staining method for differentiating granulocytes from germinal cells in Papanicolau-stained semen. *Acta Cytol* 1974;18:2-7
68. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect Of Leukocytospermia On Sperm ADN Integrity: A Negative Effect In Abnormal Semen Samples. *J Androl.* 2002;23:717-723.
69. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Melamed M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility, *Scien.* 1980;210:1131-1133.
70. Evenson D, Jost L, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000;21:739-746.
71. Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinol.* 1998; 139:2128-36
72. Fawcett D. *Tratado de Histología.* II edición, edit. Interamericana., México. 1991. p.840-850.
73. Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod.* 1970;2:90-127
74. Fernandez J, Mouriel L, Rivero M, Goyanes V, Vasquez R, Alvarez J. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm ADN fragmentation. *J. Androl.* 2003;24:59-66.
75. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm ADN fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.

76. Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, Herr JC. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat Rec* 1997;248:380-90.
77. Fredricson B., Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil. Steril.* 1977;28: 841-45.
78. Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system. *Hum. Reprod.* 2005a;20:2614-2619.
79. Gat Y, Bachar G, Evemert K, Levinger U, Gomisfc M Induction of spermatogenesis in azoospermic uten after internal spermatic veins embolization for the treatment of varicocele. *Hum Reprod.* 2005b;20:1013-1017.
80. Gat Y, Bachar G, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Physical examination may miss the diagnosis of bilateral Varicocele: a comparative study of four diagnostic modalities. *J. Urol.* 2004;172:1414-17.
81. Ghasemi N, Babaei H, Azizallahi S, Kheradmand A. Effect of long-term administration of zinc after scrotal heating on mice spermatozoa and subsequent offspring quality. *Andrologia* 2009;41:222-8.
82. Ghosh I, Chattopadhaya R, Kumar V, Chakravarty B, Datta K. Hyaluronan binding protein-1: a modulator of sperm-oocyte interaction. *Soc Reprod Fertil.* 2007;63:539-543.
83. Golan R, Cooper TG, Oschry Y, Oberpenning F, Schulze H, Shochat L, Lewin LM. Source Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod.* 1996;11:1457-62.
84. Gorelick J, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil. Steril.* 1993;59:613-616.
85. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm ADN damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20:226–30.
86. Green K, Turner T, Howard, S. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J. Urol.* 1984;131:1208-1211.
87. Greenberg SH. Varicocele and male fertility. *Fertil Steril* 1977;28:699-706.

88. Guerin JF, Ali HB, Rollet J, Souchier C, Czyba JC. Alpha-glucosidase as a specific epididymal enzyme marker: its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J Androl* 1986;7:156–162.
89. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol*. 2013;10:26-3
90. Hendry W, Sommer Y, Hall, R. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br. J. Urol*. 1973;45:684-692.
91. Holstein A. Interstitial cell system in the testis of the human embryo. *Verh Anat Ges*. 1970;64:175-1777.
92. Hudson R. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligospermic men with Varicoceles. *Fertil. Steril*. 1996;66:299-304.
93. Hurt G, Howard S, Turner T. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J. Androl*. 1986;7:271-276.
94. Hurtado de Catalfo GE, Ranieri-Casilla A, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelectomy. *Int J Androl* 2007;30:519-30.
95. Huszar G, Ozenci C, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003;79:1616-1624.
96. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati G, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18:260-267.
97. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller D, Shur B. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56:1020-1024.
98. Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic, and oligospermic men. *Biol Reprod* 1988;38:1061-1066.

99. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993;34:292-298.
100. Irvine D, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken R. ADN Integrity in Human Spermatozoa: Relationships with Semen Quality. *J Androl*. 2000;21:33-44.
101. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R; Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association Inc. Best practice policies for male infertility. *J Urol*. 2002;167:2138-44.
102. Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:59-64.
103. Jeyendran RS; Van der Ven HH; Pérez-Peláez M; Crabo BJ; Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219- 228.
104. Kalla NR, Kaur S, Ujwal N, Mehta U, Joos H, Frick J. alpha-Glucosidase activity in the rat epididymis under different physiological conditions. *Int J Androl*. 1997;20:92-5.
105. Kehr S, Malinouski M, Finney L, Vogt S, Labunsky VM, Kasaikina MV, Carlson BA, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis. *J Mol Biol* 2009;389:808-18
106. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, Zghal K, Fki H, Damak J, Bahloul A. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003;49:83-94.
107. Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biol Reprod*. 2009;81:939-47.
108. Knudson G, Ross L, Stahdreher D. Prevalence of sperm-bound antibodies in infertile men with varicocele: the effect of varicocele ligation on antibody levels and semen response. *J. Urol* 1994;151:1260-1262.

109. Koksal IT, Ishak Y, Usta M, Danisman A, Guntekin E, Bassorgun IC, Ciftcioglu A. Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier. *Arch Androl* 2007;53:43-8
110. Kornovski B, McCoshen J, Kredentser J, Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril* 1994;61:935-940.
111. Kret B, Milad M, Jeyendran RS. New discriminatory level for glucosidase activity to diagnose epididymal obstruction or dysfunction. *Arch Androl.* 1995;35:29-33.
112. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization *Urology.* 1987;30:248-51.
113. Kunnen M, Comhaire F. Nonsurgical cure of the varicocele by transcatheter embolization of the internal spermatic veins with tissue adhesive (histoacryl transparent). In Castaneda-Zuniga WR and Tadavarty SM (eds) *International Radiology*; 2nd ed. Williams & Wilkinson, Baltimore, pp. 73-100, part 2. 1992.
114. Kursh E. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril.* 1987;48:510-511.
115. Levrant S, Watanabe M, Land S, Sauer R, Jeyendran RS. The relevance of neutral alpha-glucosidase activity in andrology. *Syst Biol Reprod Med* 2009;55:116
116. Lewin LM, Shalev DP, Weissenberg R, Soffer Y. Carnitine and acylcarnitines in semen from azoospermic patients. *Fertil Steril* 1981; 36:214-215.
117. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum Reprod* 1996;11:2465-7
118. Libman J, Jarvi K, Lo K, Zini A. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy is superior for men with bilateral versus unilateral repair. *J Urol* 2006;176:2602-5
119. Liu DY, Baker HW. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod.* 2007;22:1597-1602.
120. Lome L, Ross L. Varicocelectomy and infertility. *Urology.* 1977;9:416-418.
121. Lopes S, Jurisicova A, Sun J, Casper R. Reactive oxygen species: a potential cause for ADN fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998;13:896-900.

122. Lopes S, Sun J, Jurisicova A, Meriano J, Casper R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;69:528–532.
123. MacLeod J., Gold R., The male factor in fertility and sperm morphology infertile and fertile marriage. *Fertil. Steril.* 1951, 2: 394-414.
124. Madgar, I., Weissenberg, R., Lunenfeld, B., Karasik, A. & Goldwasser, B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil. Steril.* 1995;63:120–124.
125. Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, Comhaire FH. Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. *Hum Reprod* 1998;13:591-5.
126. Manicardi G, Bianchi P, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in ADN of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995;52:864–867.
127. Mankad M, Sathawara NG, Doshi H, Saiyed HN, Kumar S. Seminal plasma zinc concentration and alpha-glucosidase activity with respect to semen quality. *Biol Trace Elem Res* 2006;110:97-106.
128. Mann, T. *Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract* Methuen, London; Wiley, New York, 1964
129. Marin-Guzman J, Mahan DC, Pate JL. Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J Anim Sci* 2000;78:1537-43.
130. Marks I, McMaftion R, Lipshultz L. Predictive parameters of successful varicocele repair. *J. Urol.* 1986;136:609-612
131. Marmar J, Kim Y. Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. *J. Urol.* 1994;152:1127-32
132. Marmar J. Varicocele and male infertility: Part II The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum. Reprod.* 2001;7:461-472
133. Martin-Deleon PA. Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function. *Int J Androl.* 2011;34: e306-18.

134. McClure R, Khoo D, Jarvi K. Subclinical varicocele: the effectiveness of varicocelectomy. *J. Urol.* 1991;145:789-791.
135. Meacham RB, Townsend RR, Rademacher D, Drose JA. The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol* 1994;151:1535-8.
136. Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991;30:346-52.
137. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5:586-92.
138. Menkveld R. Sperm morphology assessment using strict (tygerberg) criteria. *Methods Mol Biol.* 2013;927:39-50.
139. Mieusset B, Biyan L, Mondinat C. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril.* 1987;48:1006-1011.
140. Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl.* 1995;18:169-84
141. Molina R., Estofán G., Hernández M., Novillo J., Kuperman M., Estofán D. 1998. Poor determination of sperm morphology analysis (Strict Criteria) is a prognostic factor in IUI.
142. Molina R, Novillo J., Hernandez M., Olmedo J., Maldonado L., Estofán G., Estofán D. 1995. XV World Congress of Fertility and Sterility. Montpellier, France.
143. Monesi V. Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1971;13:1-14.
144. Monhi H. Yanagimachi R. Characteristics of motor apparatus in testicular epididymal and ejaculated spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 1980. 127:191-196.
145. Moore HD. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia.* 1998;30:233-9.
146. Mori MM, Bertolla RP, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents? *Fertil Steril.* 2008;90:1769-73

147. Moustafa M, Sharma R, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez M, Thomas A, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and ADN denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004;19:129-138.
148. Nakamura N, Namiki M, Okuyama A. Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril.* 1987;47: 475-480.
149. Naughton C, Nangia A, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum. Repro.* 2001;7:473-481.
150. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:473-81.
151. Ndovi TT, Parsons T, Choi L, Caffo B, Rohde C, Hendrix CW. A new method to estimate quantitatively seminal vesicle and prostate gland contributions to ejaculate. *Br J Clin Pharmacol* 2007;63:404-20.
152. Nelson W. Testicular morphology in eunuchoidal and infertile men. *Fertil Steril.* 1950;1:477-88
153. Nieschlag E, Hertle L, Pischedick A. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of vena spermatic. *Hum. Reprod.* 1998;13:2147-2150.
154. Nilsson S, Edvinsson A, Nilsson B. Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the internal spermatic vein: fact or fiction? *Br. J Urol* 1979;51:591-596.
155. Nishiyama M, Danno S, Kaneko, Y. Decreased expression of coM-inchiced RNA-binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Path.* 1998;152:289-296.
156. Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K. Selenium in human male reproductive organs. *Hum Reprod* 1998;13:2172-6.
157. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez M, Sharma R, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas A, Alvarez J. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis of male infertility. *Hum. Reprod.* 2001;16:1912-1921.
158. Olsen GP, Shields JW. Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. *Nature* 1984;309:116-7.

159. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction* 2004; 127:335-42.
160. Orgebin-Crist M. Epididymal physiology and sperm maturation. *Prog Reprod Biol* 1981;8:80-89.
161. Oshinsky G, Rodriguez M, Mellinger B. Vaficocele- related infertility is not associated with increased sperm-bound antibody. *J. Urol.* 1993;150:871-873.
162. Overstreet J., Katz D., Diel L.. Difference in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol. Reprod* 1982;26: 566.
163. Oyen O. Myklebust F. Scott J. Cadd Hansson V. Subunits of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphatedependent protein kinase show differential and distinct expression patterns during germ cell differentiation. *Biol. Reprod.* 1990;43:46-54.
164. Ozturk U, Kefeli M, Asci R, Akpolat I, Buyukalpelli R, Sarikaya S. The effects of experimental left varicocele on the epididymis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008;54:177-84.
165. Parvinen M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev.* 1982; 1;3:404-17
166. Pasqualotto F, Lucon A, de Góes P, Sobreiro B, Hallak J, Pasqualotto E, Arap S. Is it worthwhile to operate on subclinical right varicocele in patients with grade II-III varicocele in the left testicle? *J Assist Reprod Genet.* 2005;225:227-231.
167. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73:459-64.
168. Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E Jr, Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril.* 2008;89:602-7.
169. Paul C, Melton DW, Saunders PT. Do heat stress and deficits in ADN repair pathways have a negative impact on male fertility? *Mol Hum Reprod.* 2008;14:1-8.
170. Peña P, Risopatrón J, Villegas J, Miska W, Schill WB, Sánchez R. Alpha-glucosidase in the human epididymis: topographic distribution and clinical application. *Andrologia.* 2004;36:315-20.

171. Peña P, Sánchez R, Vásquez B, Castillo C, Miska W. Effects of proteolytic enzymes and sexual abstinence on alpha glucosidase biochemical quantification in human seminal plasma. *Rev Med Chil.* 2001;129:489-93.
172. Pienta K, Coffey D. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and ADN loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J. Cell Sci.* 1984;1:123-135.
173. Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol.* 1986;105:1-65.
174. Poirot C., Cherruau B. Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [revista en la Internet]. 2005 Jun [citado 2013 Abr 07] ; 39(2): 225-241. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200010&lng=es.
175. Politch JA, Wolff H, Hill JA, Anderson DJ. Comparison of methods to enumerate white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1993;60:372-5.
176. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999;14: 2513-6.
177. Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E, Huszar G. Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:177-83.
178. Pryor J, Howards S. Varicocele. *Urol Clin. North Am.* 1987;14:499-513.
179. Ramu S, Jeyendran RS. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol Biol.* 2013;927:21-5.
180. Ranganathan S, Ganguly A, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev* 1994;38:69-76.
181. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele-the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update* 2002;8:53-8.
182. Richardson I, Nagler HM. Is bilateral varicocele more detrimental to male fertility than unilateral varicocele? *Nat Clin Pract Urol* 2007;4:366-7

183. Roaiah MM, Mostafa T, Salem D, El-Nashar AR, Kamel II, El-Kashlan MS. Alpha-1,4-Glucosidase activity in infertile oligoasthenozoospermic men with and without varicocele. *Andrologia* 2007;39:28-32.
184. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online* 2010;20:711-723.
185. Safarinejad MR, Safarinejad S. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J Urol* 2009; 181:741-51
186. Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, Saâd A. Relationship between semen quality and seminal plasma components: neutral alpha glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia* 2009;41:150-6.
187. Said S, Funahashi H, Niwa K. ADN stability and thiol-disulphide status of rat sperm nuclei during epididymal maturation and penetration of oocytes. *Zygote*. 1999;7:249-54.
188. Sailer B, Jost L, Evenson D. Mammalian sperm ADN susceptibility to in-situ denaturation associated with the presence of ADN strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 1995;16:80-87.
189. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm ADN fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010;93:1027-36
190. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U. Origin of ADN damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.* 1999;4:431-437.
191. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear ADN damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 2003;80:1431-6.
192. Sarabia L. y Munuce MJ. Nuevos valores para el espermograma OMS 2010. *Rev. méd. Chile [online].* 2011;139: 548-549
193. Schlesinger M, Wilites I, Nagler H. Treatment outcome after varicocelectomy. *Urol. Clin. North Am.* 1994;21:517-529.

194. Scholler R, Nahoul K, Castanier M. Testicular secretion of conjugated and unconjugated steroids in normal adults and in patients with Varicocele. Baseline levels and time-course response to HCG administration. *J Steroid Biochem.* 1984;20:203-215.
195. Scott L, Young D. Varicocele: a study of its effect on human spermatogenesis and of the results produced by spermatic- vein ligation. *Fertil. Steril;* 1962;13:325-334.
196. Shalini S, Bansal MP. Alterations in selenium status influences reproductive potential of male mice by modulation of transcription factor NFkappaB. *Biometals* 2007;20:49-59.
197. Shalini S, Bansal MP. Dietary selenium deficiency as well as excess supplementation induces multiple defects in mouse epididymal spermatozoa: understanding the role of selenium in male fertility. *Int J Androl* 2008;31:438-49.
198. Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm ADN integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:1073-85.
199. Sharpe RM. Local control of testicular function. *Q J Exp Physiol.* 1983;68:265-87
200. Shiraishi K, Takihara H, Naito K. Testicular volume, scrotal temperature, and oxidative stress in fertile men with left varicocele. *Fertil Steril* 2009;91(Suppl):1388-91.
201. Sigman M, Lopes L. The correlation between round cells and white blood cells in the semen. *J. Urol.* 1993;388:573-574.
202. Simbini T, Umopathy E, Jacobus E, Tendaupenyu G, Mbizvo MT. Study on the origin of seminal leucocytes using split ejaculate technique and the effect of leucocytospermia on sperm characteristics. *Urol Int* 1998;61:95-100
203. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-191.
204. Sirvent J, Bernat R, Navarro M. Leydig cell in idiopathic varicocele. *Eur. Urol.* 1990;17:257-261.
205. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm ADN damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21:986-93.

206. Spano M, Bonde J, Hollund H, Kolstad H, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil. Steril.* 2000;73:43-50.
207. Stanger JD, Vo L, Yovich JL, Almahbobi G. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal ADN fragmentation. *Reprod Biomed Online.* 2010;21:474-84.
208. Steckel J, Dicker A, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. *J. Urol.* 1993;149:769-771.
209. Sun J, Jurisicova A, Casper R. Deletion of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1997;56:602-607.
210. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and ADN integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia.* 2008;40:245-51.
211. Tang J, Yan S, Zhang N, Wang M, Lu H. Influence of varicocele on sperm chromatin structure and sperm motility. *Zhon. Nan Ke Xue.* 2007;13:690-692.
212. Tinga D, Jager S, Bruijnen C. Factors related to semen improvement and fertility after varicocele operation. *Fertil. Steril.* 1984;41:404-410.
213. Turner T, Brown K, Spam C. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity effect of experimental varicocele. *J. Androl.* 1993;14:180-186.
214. Turner T, Lopez T. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J. Urol.* 1990;144:1018-1021
215. Turner T, Gleavy J, Harris J. Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *J. Androl.* 1990. 11:422-428.
216. Turner TI, Riley TA. p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 188-97
217. Uehling D. Fertility in men with varicocele. *Int. J. Fertil.* 1968;13:58-60.
218. Vergouwen R, Jacobs S, Huiskamp R, Davids J, de Rooij D. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod Fertil.* 1991;93:233-43.

219. Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI. Effect of Varicocele Grade and Age on Seminal Parameters. *Urol Int* 2010;85:194-9.
220. Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernandez R, Camejo MI. Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters. *Can J Urol*. 2011;18:5884-9.
221. Wade M, Foster W, Younglai E, McMahon A, Leingartner K, Yagminas A, Blakey D, Fournier M, Desaulniers D, Hughes C. *Toxicol Sci*. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. 2002;67:131-43
222. Walsh TJ, Wu AK, Croughan MS, Turek PJ. Differences in the clinical characteristics of primarily and secondarily infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2009;91:826-30.
223. Wang HF, Shi BK, Chu MM, Zhang KQ, Zhu YF, Li YZ, Wang HX. Expression of hypoxia induced factor-1alpha and function of epididymis in varicocele: experiment with rats *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008;88:1670-2.
224. Watanabe M, Roussev R, Ahlering P, Sauer R, Coulam C, Jeyendran RS. Correlation between neutral alpha-glucosidase activity and sperm ADN fragmentation. *Andrologia*. 2009;41:316-8.
225. Wilms G, Oyen R, Casselman J, Peene P, Steeno O, Baert AL Solitary or predominantly right-sided varicocele: a possible sign of situs inversus. *Urol Radiol* 1988; 9:243-6.
226. Witt M, Lipsmltz J. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urol*. 1993;42:541-543.
227. Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM, Copius-Peereboom JH, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol* 2001;15:131-6
228. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1992.

229. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992;57:1289-93.
230. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
231. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
232. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge. 2001
233. Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, Ong CN. The associations among semen quality, oxidative ADN damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003;534:155-63.
234. Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high ADN chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl.* 2010;31:566-72.
235. Yamaguchi S, Miura C, Kikuchi K, Celino FT, Agusa T, Tanabe S, Miura T. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10859-64.
236. Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Cap. 5, Vol I. edit. Raven Press. New York. 1988. p. 135-185.
237. Yarboroug M, Burns J, Keller F. Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicoceles. *J. Urol.* 1989;141:1372 1374.
238. Ye H, Huang G, Gao Y, Liu De Yi. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 2006;21:1545-1550.
239. Yildiz O, Gul H, Ozgok Y, Onguru O, Kilciler M, Aydin A, Isimer A, Harmankaya AC. Increased vasoconstrictor reactivity and decreased endothelial function in high grade varicocele; functional and morphological study. *Urol Res* 2003;31:323-8.

240. Yurchenco P, Schittny J. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990;4:1577-90.
241. Zhang QY, Qiu SD, Ma XN, Yu HM, Wu YW. Effect of experimental varicocele on structure and function of epididymis in adolescent rats. *Asian J Androl* 2003;5:108-12.
242. Zhao YG, Zhou J, Zhang XJ, Men XW, Wang R, Zhou F, Chen DH, Yu ZY, Shi HB. Effects of experimental varicocele on the apoptosis of epididymis epithelium and synthesizing function of the epididymis in rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2006;12:619-21.
243. Zini A, Azhar R, Baazeem A, Gabriel MS. Effect of microsurgical varicolectomy on human sperm chromatin and ADN integrity: a prospective trial. *Int J Androl.* 2011;34:14-9.
244. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm ADN denaturation in infertile men. *Urol.* 2001;58:258-261.
245. Zöpfigen A, Priem F, Sudhoff F, Jung K, Lenk S, Loening SA, et al. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, neutral alpha glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod* 2000;15:840-5.

Anexo 9.1

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DE FISIOPATOLOGÍA-DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS
CLÍNICO
CENTRO DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDAD Y ENFERMEDADES GENÉTICAS
“CEDIEG”**

AUTORIZACIÓN

Yo, _____, titular de la cédula de identidad N° _____ acepto y autorizo al CEDIEG y su grupo de investigación para que utilice la muestra de semen para realizar la investigación sobre:

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN INDIVIDUOS QUE ASISTEN AL
CEDIEG**

La muestra la entregaré en el Centro Diagnóstico de Fertilidad y Enfermedades Genéticas, de la escuela de Bioanálisis de la universidad de los andes.

En Mérida a los _____ días del mes de _____ del año en curso.

Firma: _____

C.I: _____

Anexo 9.2

Congreso Nacional (Capítulo I)

Vivas-Acevedo G, Lozano J.R., Camejo M.I. Efecto del grado y lado del varicocele sobre los parámetros seminales. LIX Convención anual de ASOVAC. Mérida 15-19 de Noviembre de 2009



Efecto del varicocele y la edad en los parámetros seminales

Vivas-Acevedo G¹, Lozano J.R.¹, Camejo M.I.²
¹ Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Departamento de Bioanálisis Clínico, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. E-mail: giovanni@ula.ve
² Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Caracas 1080 A, Venezuela.

INTRODUCCION

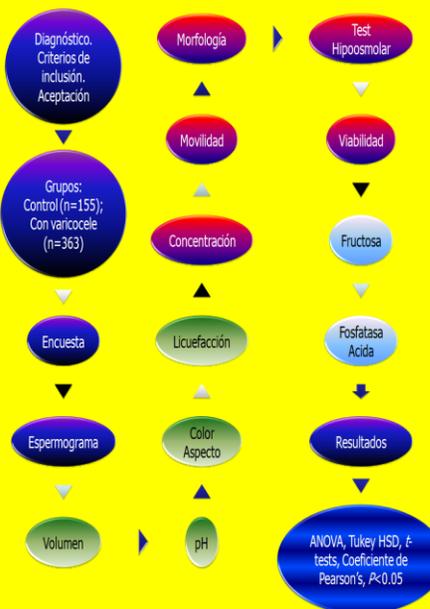


El varicocele es la dilatación del plexo pampiniforme del cordón espermático y se puede observar en ambos testículos, pero es más frecuente en el testículo izquierdo. La prevalencia en la población en general está entre 15-20%, mientras que en la infertilidad primaria entre 19-41% y en la infertilidad secundaria entre 69-94%. El varicocele izquierdo se clasifica en tres grados: Grado I; palpable con maniobras de valsalva pero no visible, Grado II; Visible y palpable con maniobras de valsalva y Grado III; visible y palpable sin maniobras de valsalva. Esta patología se asocia con disminución de la calidad seminal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) encontró alteraciones seminales en 25,4% de hombres con varicocele, mientras que el 11,7% de hombres con varicocele eran normozoospermicos, lo que demuestra que el varicocele afecta la función testicular y la fertilidad. Sin embargo, no se conoce con exactitud si el varicocele causa daño progresivo en el tiempo en hombres adultos, dado el incremento de la prevalencia del varicocele en infertilidad secundaria.

OBJETIVO

Evaluar el efecto del varicocele y la edad sobre los parámetros seminales.

MATERIALES Y MÉTODOS



El estudio se realizó en dos grupos: Control (n=155) y Con varicocele (n=363). Se evaluaron los parámetros seminales: Morfología, Movilidad, Concentración, Licuefacción, Color Aspecto, Test Hiposmolar, Viabilidad, Fructosa, Fosfatasa Ácida y Resultados. Se aplicó ANOVA, Tukey HSD, t-tests, Coeficiente de Pearson's, p<0.05.

RESULTADOS

El varicocele afecta la morfología, la movilidad, vitalidad y el HOST de los espermatozoides e incrementa los PMN en semen. La comparación de parámetros seminales entre los grados de varicocele, mostró disminución de la morfología solo en el grado III. En el porcentaje de pacientes normozoospermicos fue 50% y 24% en varicocele izquierdo grado I y III, respectivamente. Se observó una correlación negativa entre el incremento de la edad y la disminución de la movilidad espermática en los individuos con varicocele.

Tabla 1. Características seminales de hombres con varicocele (n= 363), de acuerdo a la OMS y la presencia de varicocele.

	Pacientes nº (%)	Edad (mean ± SD)	HOST (%)	Izquierdo grado I (n=80)	Izquierdo grado II (n=118)	Izquierdo grado III (n=41)	Bilateral (n=105)	Derecho (n=19)
Normozoospermia	144 (39.7)	27.4 ± 8.0	57.4 ± 11.3	40 (50.0)	41 (34.8)	10 (24.4)	43 (41.0)	10 (52.6)
Astenozoospermia	44 (12.1)	28.7 ± 9.6	50.4 ± 14.5	13 (16.3)	19 (16.1)	2 (4.9)	8 (7.6)	2 (10.5)
Astenoteratozoospermia	64 (17.6)	29.0 ± 9.9	46.5 ± 13.7	12 (15.0)	15 (12.7)	11 (26.8)	25 (23.8)	1 (5.3)
Teratozoospermia	47 (13.0)	28.2 ± 8.1	49.7 ± 12.9	5 (6.3)	14 (11.9)	13 (31.7)	13 (12.4)	2 (10.5)
Oligozoospermia	15 (4.1)	30.3 ± 11.7	43.1 ± 12.5	1 (1.3)	7 (5.9)	1 (2.4)	5 (4.8)	1 (5.3)
Oligoteratozoospermia	8 (2.2)	27.5 ± 6.0	43.6 ± 16.4	1 (1.3)	3 (2.5)	0 (0.0)	3 (2.9)	1 (5.3)
Oligoastenoteratozoospermia	30 (8.3)	30.5 ± 8.7	27.4 ± 16.2	3 (3.8)	18 (15.3)	3 (7.3)	6 (5.7)	0 (0.0)
Azoospermia	11 (3.0)	33.8 ± 5.7	-	5 (6.3)	1 (0.9)	1 (2.4)	2 (1.9)	2 (10.5)

Valores expresados como número de pacientes (%)

Tabla 2. Características seminales de pacientes con y sin varicocele, distribuidos por rango de edad.

	Sin varicocele				Con varicocele			
	< 20 años (n=8)	21-30 años (n=60)	31-40 años (n=60)	>41 años (n=27)	< 20 años (n=66)	21-30 años (n=164)	31-40 años (n=87)	>41 años (n=35)
Volumen (mL)	3.7 ± 1.1	3.7 ± 1.0	3.7 ± 1.1	3.7 ± 1.1	2.9 ± 1.6	3.7 ± 1.6	3.5 ± 1.6	3.1 ± 1.7
Espermatozoides (x 10 ⁶ /mL)	64.2 ± 41.5	63.8 ± 42.7	72.0 ± 41.4	51.7 ± 29.5	81.0 ± 54.8	73.5 ± 47.5	60.6 ± 49.4	70.5 ± 45.8
Morfología (% normal)	34.5 ± 3.3	37.2 ± 6.2 ^b	37.3 ± 5.5 ^b	33.9 ± 5.6	31.8 ± 9.3	31.5 ± 10.5	28.9 ± 9.1	31.0 ± 11.5
Movilidad (a+b, %)	65.8 ± 4.9 ^a	68.8 ± 9.2 ^b	69.3 ± 9.4 ^b	65.3 ± 8.0 ^b	50.0 ± 18.9	54.3 ± 18.7	48.3 ± 20.6	45.7 ± 21.2 ^c
Vitalidad (%)	79.9 ± 4.1 ^a	79.9 ± 5.1 ^b	79.5 ± 3.8 ^b	81.7 ± 5.6 ^b	62.1 ± 15.7	65.9 ± 15.2	60.5 ± 18.2	63.1 ± 16.9
HOST (%)	66.9 ± 1.0 ^b	67.7 ± 2.8 ^b	67.8 ± 3.0 ^b	67.0 ± 1.7 ^b	49.4 ± 15.3	52.0 ± 15.2	48.2 ± 15.6	46.5 ± 15.8
PMN (x 10 ⁶ /mL)	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.2 ^b	0.5 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.8	1.0 ± 0.9	1.0 ± 1.1	1.0 ± 0.7

Los valores están expresados como media ± SD. HOST: Test Hiposmótico. PMN: polimorfnucleares. ^a p<0.01, ^b p<0.0001 vs grupo con varicocele en el mismo rango de edad; ^c Correlación negativa entre edad y movilidad en el grupo con varicocele. No se observó correlación significativa en el grupo sin varicocele.

CONCLUSIONES

El grado de varicocele determina el nivel de alteración sobre la calidad seminal. Adicionalmente, el potencial de fertilidad podría estar afectado con el incremento de la edad en individuos con varicocele debido a la disminución de la movilidad de los espermatozoides.

Anexo 9.3

Publicación en revista indizada en el SCI (Capítulo I)

Original Paper

Urologia
Internationalis

Urol Int 2010;85:194–199
DOI: 10.1159/000314226

Received: January 13, 2010
Accepted after revision: February 16, 2010
Published online: April 29, 2010

Effect of Varicocele Grade and Age on Seminal Parameters

Giovanny Vivas-Acevedo^a Jesús Ricardo Lozano^a María Isabel Camejo^b

^aCentro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Departamento de Bioanálisis Clínico, Universidad de Los Andes, Mérida, and ^bUniversidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Caracas, Venezuela

Key Words

Hypoosmotic swelling test · Left varicocele · Leukocytes · Semen parameters · Varicocele grade

suggests that both the varicocele grade and an increase of age in men with varicocele could determine the extent of alteration to semen quality. Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Abstract

Aim: To evaluate the effect of presence, grade and anatomical side of varicocele on semen parameters and to identify age-related modifications in semen quality in men with varicocele. **Methods:** A prospective clinical study was performed in 363 men with varicocele and 155 normozoospermic men without varicocele. We determined the presence, grade and anatomical localization of varicocele: left (grades I–III), right or bilateral. Additionally, evaluation of semen was done and the hypoosmotic swelling test (HOST) percentage determined. **Results:** The percentage of spermatozoa with normal morphology, motility, vitality, and HOST was reduced in patients with varicocele. Comparison of semen parameters between the different degrees of left varicocele (I, II or III) shows that the percentage of normal sperm morphology is reduced in men with varicocele grade III, while other parameters are not affected. The percentage of patient normozoospermic was 50 and 24% in men with left varicocele grades I and III, respectively. A negative correlation between increase of age in men and sperm motility was observed only in the varicocele group. **Conclusions:** This study

Introduction

Varicocele is defined as a dilatation of the pampiniform venous plexus of the spermatic cord and occurs more frequently on the left side. The prevalence of varicocele in the general population is estimated to be 15–20% [1, 2], while it is present in 19–41% and 69–94% in men with primary infertility and secondary infertility, respectively [3, 4]. The etiology of varicocele is controversial, with theories ranging from anatomical variations, to venous reflux secondary to congenital and/or acquired valve dysfunction, to venous obstruction [5]. In addition, it has been proposed that factors such as hyperthermia, testicular blood flow and venous pressure changes, reflux of products of renal/adrenal origin, hormonal dysfunction, autoimmunity, oxidative stress and apoptosis may be involved in the pathogenesis of varicocele [5–7].

Vascular lesions of varicocele have been arbitrary divided into three grades based on physical findings: *grade III or large varicocele*: visible on clinical examination;

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
0042-1138/10/0852-0194\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ujin

María Isabel Camejo
Departamento de Biología de Organismos
Universidad Simón Bolívar
Caracas 1080 A (Venezuela)
Tel. +58 212 906 3077, Fax +58 212 373 6243, E-Mail mcamejo@usb.ve

Anexo 9.4 (Capítulo II)

Vivas-Acevedo G, Lozano J.R., Camejo M.I. Relación de fructosa y fosfatasa ácida prostática seminal con la calidad del semen en hombres con varicocele. LIX Convención anual de ASOVAC. Mérida 15-19 de Noviembre de 2009



Fosfatasa ácida prostática y fructosa plasmática seminal en hombres con varicocele

Vivas-Acevedo G¹, Lozano J.R.¹, Camejo M.I.²

¹ Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Departamento de Bioanálisis Clínico, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. E-mail: giovanny@ula.ve
² Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Caracas 1080 A, Venezuela.



INTRODUCCION

El varicocele o dilatación venosa del plexo pampiniforme, se debe a la incompetencia de las válvulas venosas y ha sido reconocido como la causa más común de la infertilidad masculina en los adultos. La tasa de prevalencia de varicocele es de aproximadamente el 15% y 40% en hombres sanos y tratados en clínicas de infertilidad, respectivamente.

El varicocele se ha asociado con disminución de la calidad seminal. Sin embargo, hay poca información sobre la composición bioquímica de semen en pacientes con varicocele y su efecto sobre los parámetros seminales.

El semen está constituido por la contribución del fluido del epidídimo, de la próstata, la vesícula seminal y las glándulas parauretrales y bulbouretrales. Cada glándula contribuye con diferentes moléculas en la eyaculación. La fructosa es la fuente principal de hidratos de carbono en el plasma seminal y esencial para la motilidad de los espermatozoides normales. Se observó que la motilidad del espermatozoide puede estar influenciada por los componentes del plasma seminal.

OBJETIVOS

Determinar la concentración de fructosa y la actividad de la fosfatasa ácida prostática (PAP) seminal en individuos sin varicocele y hombres con varicocele y establecer la posible correlación de estos marcadores con parámetros seminales.

RESULTADOS

No se observó diferencia significativa en los niveles de fructosa entre los diferentes grupos, mientras que se observó un incremento en la actividad PAP en el grupo de varicocele. Sin embargo, el grupo con varicocele derecho presentó una reducción significativa en el volumen y los niveles de fructosa, con un aumento de la actividad PAP. Además, el aumento de la fructosa y PAP se asoció con un aumento del volumen seminal y la concentración espermática. Por otra parte en el grupo de varicocele un aumento en PMN estuvo asociado con un incremento en el volumen seminal, concentración, morfología y motilidad espermática.

MATERIALES Y METODOS

Control (n=155)
Con varicocele (n=363)

Diagnóstico
Criterios
Aceptación

Espermatograma
Encuesta.

Morfología
Motilidad
Concentración
Test Integridad de Membrana
Fructosa seminal
Fosfatasa ácida
PMN

ANOVA, Tukey HSD, t-tests,
Coeficiente de Pearson's, $P < 0.05$

Tabla 1: Niveles de fructosa y actividad PAP seminal en grupo sin varicocele, grupo total con varicocele, varicocele izquierdo (I,II,III), derecho y bilateral

	Volumen (mL)	Fructosa (mg/mL)	Fructosa (mg/eyaculado)	PAP (UI/mL)	PAP (UI/eyaculado)
Grupo sin varicocele (n=155)	3.7 ± 1.0	259 ± 49	957 ± 308	611 ± 137	2270 ± 800
Grupo varicocele total (n=352)	3.4 ± 1.6	278 ± 122	981 ± 638	703 ± 299 ^a	2383 ± 1529
Varicocele Izquierdo (I) (n=75)	3.5 ± 1.5	299 ± 152	1048 ± 655	725 ± 278	2476 ± 1373
Varicocele Izquierdo (II) (n=117)	3.4 ± 1.7	274 ± 112	965 ± 623	711 ± 315	2402 ± 1730
Varicocele Izquierdo (III) (n=40)	3.4 ± 1.8	284 ± 119	1039 ± 824	689 ± 352	2428 ± 1866
Varicocele Bilateral (n=103)	3.6 ± 1.6	276 ± 111	991 ± 576	676 ± 282	2318 ± 1288
Varicocele Derecho (n=17)	2.8 ± 1.3 ^b	217 ± 96 ^b	600 ± 403 ^b	746 ± 245	2133 ± 1300

^ap<0.0003 vs grupo sin varicocele; ^bp<0.01 vs varicocele izquierdo; PAP= Actividad Fosfatasa Ácida Prostática.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que varicocele izquierdo que no altera la secreción de fructosa por las vesículas seminales, pero sus efectos sobre la secreción de la próstata no están claras. El origen y la consecuencia del aumento en PMN durante el varicocele necesita ser evaluado.

Tabla 2: Coeficiente de correlación entre niveles de fructosa plasmática seminal, actividad de PAP y parámetros seminales entre el grupo con y sin varicocele.

Correlación entre variables		R Pearson
Grupo sin varicocele	Fructosa (mg/eyaculado) vs Volumen (ml)	0.82
	Espermatozoides/eyaculado	0.35
	PMN (x 10 ⁶ /eyaculado)	0.38
	PAP (mg/eyaculado)	0.68
	Vitalidad (%)	-0.16
Grupo con Varicocele	PAP (mg/eyaculado) vs Volumen (ml)	0.79
	Espermatozoides/eyaculado	0.43
	PMN (x 10 ⁶ /eyaculado)	0.30
	Fructosa (mg/eyaculado)	0.68
	Fructosa (mg/eyaculado) vs Volumen (ml)	0.77
Grupo con Varicocele	Espermatozoides/eyaculado	0.25
	PMN (x 10 ⁶ /eyaculado)	0.28
	PAP (mg/eyaculado)	0.48
	Volumen (ml)	0.66
	Espermatozoides/eyaculado	0.33
	PMN (x 10 ⁶ /eyaculado)	0.30
	% motilidad (a+b)	0.11
	% HOST	0.13
	PMN (x10 ⁶ /eyaculado)	0.39
	Volumen (ml)	0.29
	Espermatozoides/eyaculado	0.23
	Morfología (% normal)	0.12
	% motilidad (a+b)	0.11

Todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas. Los pacientes con azoospermia no se incluyeron en el análisis estadístico.

Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters

Giovanny Vivas-Acevedo, MS,¹ Ricardo Lozano-Hernandez, MS,¹ Maria I. Camejo, PhD²

¹Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas, Mérida, Venezuela

²Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

VIVAS-ACEVEDO G, LOZANO-HERNANDEZ R, CAMEJO MI. Markers of accessory sex glands function in men with varicocele, relationship with seminal parameters. *The Canadian Journal of Urology*. 2011;18(5):0000-0000.

Introduction: Varicocele has been associated with decreased semen quality, not much is known about the effect of varicocele on the accessory sex glands function. The purpose of this study was to evaluate the relationship among varicocele, seminal parameters and biochemical markers of accessory sex glands: neutral alpha glucosidase (NAG, epididymis), fructose (seminal vesicles), prostatic acid phosphatase (PAP) and zinc (prostate).

Materials and methods: A clinical study was performed in 190 men with varicocele and 100 men normozoospermic as control group. Semen analysis, hypoosmotic swelling test (HOST), polymorphonuclear (PMN), fructose, zinc, PAP and NAG were determinate. Differences were evaluated by, *t* test, ANOVA and a Pearson's coefficient correlation.

Results: Varicocele group showed a decrease in sperm motility, normal morphology, HOST and vitality. No differences were observed in fructose, PAP and zinc levels between control and varicocele group. The NAG was significantly decreased in varicocele group. A positive correlation was observed between both fructose and PAP with semen volume, sperm concentration, PMN, and zinc levels. Additionally, a decrease of NAG was correlated with a decrease of normal sperm morphology, motility, vitality and HOST.

Conclusions: Varicocele does not alter fructose secretion by seminal vesicles and PAP and zinc by prostate. Varicocele is associated with a decrease of NAG activity in seminal fluid, suggesting epididymal dysfunction possibly associated with a detrimental in sperm quality.

Key Words: fructose, neutral alpha glucosidase (NAG), prostatic acid phosphatase (PAP), sperm, varicocele, zinc

Introduction

The accessory sex glands play an important role in the acquisition of sperm fertilization potential. It has been reported that sperm motility may be influenced

by the components of seminal plasma.^{1,2} The semen is constituted by the contribution of the testicular-epididymal fluid (< 10%), prostatic (20%-40%), seminal vesicles (50%-80%) and urethral and bulbourethral glands (< 10%).³ Each gland contributes with different molecules in the ejaculation: carnitine, neutral alpha glucosidase and glycerophosphocholine from epididymis, citrate, zinc and prostatic acid phosphatase from prostate and fructose and prostaglandins from seminal vesicles.⁴

Varicocele has been associated with decreased sperm quality.^{5,7} However there is little information

Accepted for publication June 2011

Address correspondence to Dr. Maria Isabel Camejo, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Caracas 1080 A, Venezuela

Anexo 9.6

Publicación en revista indizada en el SCI (Capítulo III)

Biol Trace Elem Res (2011) 143:1247–1254
DOI 10.1007/s12011-011-8957-5

Selenium, Copper and Zinc in Seminal Plasma of Men with Varicocele, Relationship with Seminal Parameters

María Isabel Camejo · Lyzeth Abdala ·
Giovanny Vivas-Acevedo · Ricardo Lozano-Hernández ·
Miriam Angeli-Greaves · Eduardo D. Greaves

Received: 11 November 2010 / Accepted: 5 January 2011 /
Published online: 15 January 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Varicocele has been associated with decrease in seminal parameters. Selenium (Se), copper (Cu), and zinc (Zn) are trace elements essential for normal spermatogenesis of mammals and play a critical role as antioxidant defense system enzymes. Se, Cu, and Zn are associated with sperm quality in fertile and infertile men. However, there is little information about Se, Cu, and Zn concentrations in semen in patients with varicocele and its association with seminal parameters. The purpose of this study was to determine the concentrations of Se, Cu, and Zn in semen of patients with varicocele and the relationship with seminal parameters. Total Reflection X-Ray Fluorescence was used for the first time in the seminal fluid analysis. The concentration of selenium in men with varicocele was smaller than the normozoospermic group, while no differences were observed for both concentrations of zinc and copper. A significant positive correlation between zinc and selenium concentration was observed. Selenium in seminal plasma correlates with a good spermatozoa concentrations, motility, and morphology. Additionally, a significant positive correlation was observed between zinc levels and sperm count. In conclusion, a decrease in selenium concentration was associated with detriment of seminal parameters. A study should be conducted to evaluate the benefits of both zinc and selenium supplementation to improve seminal parameters in patients with varicocele.

Keywords Varicocele · Selenium · Copper · Zinc · Sperm concentration · Seminal parameters · TXRF

M. I. Camejo (✉)
Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Baruta, Caracas 1080, Venezuela
e-mail: mcamejo@usb.ve

L. Abdala · E. D. Greaves
Departamento de Física, Universidad Simón Bolívar, Baruta, Caracas 1080, Venezuela

G. Vivas-Acevedo · R. Lozano-Hernández
Centro Diagnóstico de Infertilidad y Enfermedades Genéticas (CEDIEG), Departamento de Bioanálisis Clínico, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

M. Angeli-Greaves
Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Anexo 9.7

Congreso Internacional (Capítulo IV)

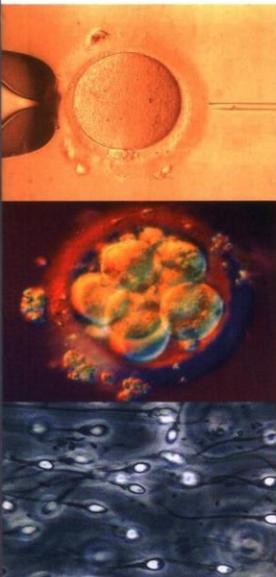
Vivas-Acevedo G, Lozano J.R. Camejo M.I. Hyaluronic acid binding by human sperm in patients with varicocele. 20th World Congress on Fertility and Sterility, Munich Sep 12 al 16 de 2010

Volume 7 (2010) // Number 4 // ISSN 1810-2107

Journal of
Reproductive Medicine No. 4 2010
and Endocrinology

– Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie –

Andrology • Embryology & Molecular Biology • Endocrinology • Ethics & Law • Genetics
Gynaecology • Contraception • Psychosomatic Medicine • Reproductive Medicine • Urology



IFFS 2010
20th World Congress on Fertility and Sterility
September 12–16, 2010
Munich, Germany

Key-Note Lectures – Monday, September 13, 2010
Are we Meeting the Global Challenges of Effective Contraception?
R. J. Paulson

Key-Note Lectures – Tuesday, September 14, 2010
Safety Issues in Hormonal Replacement Therapy
A. O. Mueck

Key-Note Lectures – Wednesday, September 15, 2010
Thirty Years Now – But Can We Say IVF is Safe?
K.-G. Nygren

Key-Note Lectures – Thursday, September 16, 2010
Omics: Tools for Personalized Reproductive Medicine
S. Hamamah et al.

Trilogy 5 / Choosing the Best Embryo
Abstracts – Oral Presentations
Abstracts – Poster Presentations

Official Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

www.kup.at/repromedizin Vertriebskennzeichen der Deutschen Post: Y-64238 Preis: EUR 20,- Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus
Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Results The quality of spermatozoa obtained from smokers were much lower than non-smokers ($p < 0.01$). The sperm concentration, viability and forward progression were negatively correlated with cigarette smoking ($p < 0.01$).

Conclusions Smoking does affect the semen quality of infertile men.

**W-008 Male infertility
Management of azoospermia in
Togo: Proposition of a predictive
sperm retrieval index (SRI)**

*Adje M.K., Kofani K., Aduayi A.K., Ekue A.,
Dally M., Boulanger R.
Clinic BIASA, Fertility Center, Lome, Togo; Center
Hospitalier de Poissy, Medecine de la Reproduction,
Poissy; Clinic du Parisis, Center d'AMP, Corneilles en
Normandie, France*

Introduction Advances in ART including IVF, then getting pregnant with testicular sperm have change azoospermia treatment. Thus arose various methods of exploration and collection of sperm more or less traumatic, invasive and risky. From observations in our practice we are using a simple predictive Sperm Retrieval Index for obtaining sperm (called the Index 120), which guides the care in azoospermia.

Patients and Methods This is a study with retrospective and prospective. Between 1998 and 2008 we analyzed clinical and biological (including FSH level) data of azoospermia patients, treated at the Clinique BIASA Lome.

For these patients, azoospermia was confirmed by at least 2 semen analysis. Sperm were collected by Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration (MESA) or Testicular Sperm Extraction (TESE).

According to these results, a correlation between a normal testicular volume, and a low level of FSH with good results of MESA let us to imagine a predictive relation; (FSH X testicular volume = SRI. When SRI is lower than 120, we have all the chances to obtain sperm by MESA or by TESE. After the establishment of this Index any surgical sperm retrieval is guided by it. We present the results of our work and the arguments for validation of this Sperm Retrieval Index "Index 120".

**W-009 Male infertility
Etiopathological analysis of 200
cases of azoospermia seen in a
private infertility center**

*Devalla S.N.
Fertility Care India, Obstetrics and Gynaecology, Mumbai;
Mumbai Hospital Institute of Medical Sciences,
Obstetrics and Gynaecology, Mumbai, India*

Introduction The number of couples affected by infertility is currently estimated to 15% of all couples attempting to have children. The difficulties are attributable to

significant male factor alone in 30% of couples and to a condition of combined male and female factors in an additional 20%, the rest being due to female factor alone or unexplained infertility.

Objectives To arrive at an etio-pathological diagnosis of 200 cases of azoospermia attending a private infertility center at Mumbai, in the last decade.

Materials and Methods A prospective study of 200 patients with azoospermia by evaluation of their clinical presentation, hormonal status, and testicular biopsy.

Results and Discussion

1. Testicular volume and basal plasma FSH levels were found to be the most useful parameters in evaluation.
2. Hypogonadism with azoospermia was seen in several patients requiring institution of androgen therapy. We also came across Fertile Eunuch Syndrome, hypopituitary Gonadotropin Deficiency as well as karyotype abnormalities.
3. Prolactin levels were useful only in those males (1 in our study) who presented with sexual dysfunction.
4. Semen volume, fructose, pH was invaluable in confirmation of congenital absence of vas deferens and seminal vesicles and in ejaculatory duct obstruction. The above can be confirmed by transrectal ultrasound.
5. Testicular Biopsy is useful in a limited number of cases.

Detection of AZF on the long arm of the Y chromosome although desirable is not available in our city and hence could not be studied. Based on our study a simple flow chart for the etio-pathological diagnosis of azoospermia has been devised.

Conclusion Azoospermia is not a dead end in the management of male infertility. In our patients we found that therapy could be offered in the form of NSAIDS, antibiotics, clomiphene citrate, androgen therapy, gonadotrophin therapy, micro-surgical intervention and therapeutic donor insemination, etc. ICSI can be advised to patients who can afford it. Adoption advice should not be overlooked.

**W-010 Male infertility
History of cryptorchidism and
ejaculate volume as simple predictive
parameters for the presence
of testicular sperm**

*Fedder J.
Horsens Hospital, Laboratory of Reproductive Biology,
Scientific Unit & Fertility Clinic, Horsens, Denmark*

Introduction Testicular volume, hormones and growth factors are used for prediction of the chance to find motile testicular sperm in azoospermic men. In this study, the possible predictive value of very simple parameters such as systematic history, clinical examination, and determination of ejaculate volume was evaluated.

Materials and Methods 262 consecutive non-vasectomized men with azoospermia/asthenospermia were evaluated by systematic history, clinical examination, ultrasonography of the scrotal content, and hormonal and genetic analyses. Hormonal analyses included as a minimum determination of FSH, LH, and testosterone, while genetic analyses included karyotyping and examination for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene mutations and Y micro-deletions.

Results In 76 (29%) probable genetic causes were detected. For men with at least one CFTR mutation, motile sperm could be detected in 100% of 13 men with Congenitally Bilateral Absence of Vasa Deferentia (CBAVD) but only in 44% of 18 with present Vasa Deferentia (VD). Ejaculate volumes were significantly lower (2.3 mL against 3.6 mL) in 81 men with motile testicular sperm detected compared to 111 men without detectable motile sperm ($p < 0.001$, Student's t-test). Furthermore, an inhomogeneous histological pattern with maturation of sperm in little islands isolated in tissue showing Sertoli cell only-pattern seems characteristic for men with a history of cryptorchidism (negative predictive value: 95%).

Conclusions In addition to FSH, testicular volume, and other endocrine factors, it is important to remember that very simple factors such as ejaculate volume and presence or absence of VD in men with CFTR mutations might be used as prognostic factors according to the chance of finding motile testicular sperm. Evidence for a strong association between a history of cryptorchidism and an inhomogeneous histological pattern with maturation of sperm in little islands in tissue showing only Sertoli cells might indicate that multiple Testicular Sperm Extractions (TESEs) should be considered particularly in men with a history of cryptorchidism.

**W-011 Male infertility
Hyaluronic acid binding by human
sperm in patients with varicocele**

*Vivas-Acevedo G., Lozano J.R., Camejo M.L.
Universidad de los Andes, Departamento de Bionálisis
Clínico, Mérida; Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Caracas, Venezuela*

Varicocele has been associated with decreased semen quality. However the conventional semen analysis does not give information on quality of sperm membrane. Recently, a very simple test, the sperm-hyaluronan-binding assay has been developed as a commercial diagnostic kit for assessing sperm maturity and function. The purpose of this study was to determinate both sperm-hyaluronan-binding assay (HBA) and hyposmotic swelling test (HOST) as markers of the functioning of sperm membrane, to establish the possible correlation with varicocele and with classic seminal parameters, such as sperm concentration, motility and morphology. Patients with varicocele grade II and grade III and normozoospermic men without varicocele

were evaluated. Were performed the semen analysis, hypoosmotic swelling test and sperm-hyaluronan-binding assay. There were no differences in age and sperm concentration between the groups with and without varicocele. There was a 50% decrease in the percentage of test of sperm-hyaluronan-binding assay in the group with varicocele compared with without varicocele group. Also the varicocele group showed a decrease in the percentage of HOST. The correlation analysis of total of patients showed that both the HBA as HOST assays are positively correlated with good sperm morphology and progressive motility. Additionally, we found a positive correlation, statistically significant, between HOST and HBA. These results indicate that varicocele causes impaired sperm membrane which is reflected in reduction of HBA and HOST assays, which correlate with a decrease in the good morphology and sperm motility. Changes in the quality of the sperm membrane may interfere with process as motility, capacitation, acrosome reaction, sperm-oocyte fusion and male fertility.

W-012 Male infertility
Human sperm DNA integrity versus other standard semen parameters

Teßmann K¹, Bürger D¹, Unterhorst E¹, Scholtes M¹
FertiGen GmbH, Kryo- und Samenbank, Düsseldorf¹
Center for Reproductive Medicine, Düsseldorf, Germany

DNA integrity in human sperm seems to play an important role in the outcome of assisted reproductive techniques ART, due to the effect on fertilization, embryo quality and pregnancy rates. The efficacy of regular insemination is questionable when the DNA integrity is increased.

The relationship between conventional sperm parameters and DNA fragmentation status is still unclear. The objective of our study was to examine the correlation between sperm parameters, such as concentration, motility and forward progression, and the level of DNA integrity.

The analyses was done with the indirect assay (Sperm Chromatin Structure Assay; SCSA) and the genetic integrity was identified by DFI (DNA Fragmentation Index) representing the DNA strand breaks. In our study we've only included patients undergoing fertility treatment. We have found a significant negative correlation between genetic integrity and sperm count, motility and rapid motility. Patients showing a high DFI reveal reduced sperm count and impaired motility in all three DFI groups (< 15%, > 15% and > 25%).

We advise that the assessment of the sperm DNA damage should be a part of the initial semen analysis for fertility patients. Further data analysis is needed to investigate the predictive value of the DNA fragmentation index in ART cycles.

W-013 Male infertility
CAG polymorphism and mutations of the androgen receptor genes in fertile and infertile agriculture men

Frassinetti R¹, Mandelli J¹, Borges Jr. E², Braga D.P.A.F^{2,3}, Figueira R.C.S⁴, Pasqualotto E.B⁵, Pasqualotto F.F⁶
¹University of Caxias do Sul, Caxias do Sul; ²Fertility - Assisted Fertilization Center, Clinical Department, Sao Paulo; ³Sapientiae Institute - Educational and Research Center in Assisted Reproduction, Scientific Research, Sao Paulo; ⁴Fertility - Assisted Fertilization Center, Scientific Research, Sao Paulo; ⁵Fertility - Assisted Fertilization Center, IVF Laboratory, Sao Paulo, Brazil

Introduction The beginning of the spermatogenesis is linked to cellular events responded to androgens. The hormonal action of 2 important androgens (testosterone and 5- α dihydrotestosterone) is mediated by the androgen receptor (AR). The aim of this study was to molecularly characterize the mutations and the CAG polymorphisms in a population of infertile men who lives in a rural region, with the diagnosis of idiopathic infertility.

Materials and Methods In this prospective study, we compared 45 rural men with idiopathic infertility with 45 rural men who had a previous child in the last year. In the group of infertile men, all women had a child from a previous relationship. DNA was obtained from the lymphocytes' blood and from cells of the oral mucosa through smear provided in a commercial kit (Wizard Genomic Purification) used to evaluate the AR.

Results Differences were detected in the semen analysis in the group of infertile men compared to normal semen donors: sperm concentration (mean \pm SD) (30.1 \pm 36.5 vs 57.1 \pm 23.2; p=0.03), sperm motility (40.93 \pm 20.7 vs 52.3 \pm 14.5; p = 0.03), sperm morphology according to the WHO (10.7 \pm 6.55 vs 36.5 \pm 4.2; p = 0.03) and Tygerberg's strict criteria (3.8 \pm 2.8 vs 8.3 \pm 3.1; p = 0.03) No differences were found on CAG in the group of infertile patients when compared to the normal healthy men (20.04 \pm 3.93 vs 20.64 \pm 3.71, respectively; p = 0.09). In the group of infertile men, 12 alleles were identified: the most common were the 20 (17.8%) and the 21 (20%) CAG, both identified in 8 patients. In the control group, 13 alleles were found: the 18 (15.55%) and the 21 (20%) were the most common, being identified in 7 and 9 patients, respectively. No correlation was found between the polymorphism CAG and sperm concentration (r = 0.227; p = 0.134), sperm motility (r = 0.202; p = 0.184), and sperm morphology according to the Tygerberg's strict criteria (r = 0.210; p = 0.213). A weak association between the CAG repetitions and sperm morphology according to the WHO was found (r = 0.349; p = 0.032). The mean of CAG repetitions in the group of patients with severe oligospermia was higher (22.2 \pm 3.59) than the control group (20.64 \pm 3.71; p = 0.03).

Conclusions Our results suggest that, in agriculture patients with severe oligosper-

mia, the evaluation of the AR may be an important tool in order to detect the reason of the infertility. Studies with more patients must be performed to confirm our data.

Funding None.

W-014 Male infertility
Comparison of ICSI cycle outcomes after MESA/TESE in case of obstructive and nonobstructive azoospermia

Khomassuridze A., Nishianidze S., Tsagareishvili G., Khonelidze N., Koiava M., Qsidze K.
Zhardania Institute of Human Reproduction, Tbilisi, Georgia

Introduction Development of ICSI method made it possible to have children to otherwise infertile azoospermic men. There are several technical ways to gain motile spermatozoa which can be used for oocyte fertilization. Depending on the etiology of azoospermia for sperm retrieval mostly are used MESA or TESE techniques. Our goal was to evaluate ICSI cycle outcomes after TESE and MESA in the patients with obstructive and nonobstructive forms of azoospermia.

Materials and Methods ICSI cycle outcomes in the 25 infertile pairs who underwent TESE or MESA for sperm extraction were retrospectively analyzed. In all the patients cytogenetic study was normal because abnormal results were criteria for exclusion from the study. In the 14 of men (group 1) azoospermia was obstructive (OA), in the 11 (group 2) azoospermia was nonobstructive (NOA). Mean age of men as well as women was similar. Ovarian stimulation was done with GnRH flare-up or GnRH antagonist protocol with FSH starting dose of 225 IU. MESA/TESE was performed on the day of oocyte aspiration. In all the patients consecutive MESA and TESE was conducted with subsequent ICSI. Embryo transfer routinely was done on the 3rd day after transvaginal puncture of ovaries. When available, sperm and embryos were cryopreserved.

Results Spermatozooids were obtained in 92.8% (13/14) in OA group and in 54.5% (6/11) in the NOA group. Fertilization rate was 83% and 76% (p > 0.05), biochemical pregnancy and clinical pregnancy rates were 7/13 (53.8%) and 3/6 (50%) (p > 0.05), 5/13 (38.6%) and 2/6 (33.3%) (p > 0.05) in OA and NOA respectively.

Conclusion Men with both obstructive and non-obstructive forms of azoospermia have quite good chance of having child with trend to better, but not statistically significantly, results with obstructive form of azoospermia.

Anexo 9.8

Congreso Internacional (Capítulo IV)

Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Camejo MI Integridad del núcleo espermático (SCD) y calidad de la membrana por el test de la unión del espermatozoide al ácido hialurónico (HBA) en pacientes con varicocele. XXII Reunión bienal de la asociación latinoamericana de investigadores en Reproducción Humana. 12-14 octubre 2011. Ciudad de Panamá. Panamá.

