



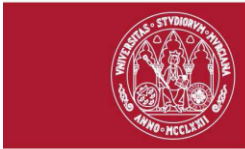
UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Eficacia de la Terapia con
Antioxidantes Ácidos Grasos Omega-3 y
Combinados en el Varón Subfértil con
Astenofermia Idiopática que precisa de
Técnicas de Reproducción Asistida**

D^a. Consuelo López Martínez

2016



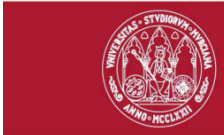
D. EUGENIO LÓPEZ LÓPEZ, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, Área de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, Departamento de CIRUGÍA, PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada

“EFICACIA DE LA TERAPIA CON ANTIOXIDANTES ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y COMBINADOS EN EL VARÓN SUBFÉRTEL CON ASTENOSPERMIA IDIOPÁTICA QUE PRECISA DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”

realizada por D^a. CONSUELO LÓPEZ MARTÍNEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Abril de 2016



D. ANIBAL NIETO DÍAZ, Profesor Titular acreditado para Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, Área de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, Departamento de CIRUGÍA, PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada

“EFICACIA DE LA TERAPIA CON ANTIOXIDANTES ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y COMBINADOS EN EL VARÓN SUBFÉRIL CON ASTENOSPERMIA IDIOPÁTICA QUE PRECISA DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA”

realizada por D^a. CONSUELO LÓPEZ MARTÍNEZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Abril de 2016

a mis padres

a Pablo

Agradecimientos

En primer lugar agradecer toda la ayuda recibida por el equipo de la Unidad de Reproducción del Hospital La Vega Murcia. Mercedes y Rosa, gracias por vuestra ayuda en la búsqueda de las historias clínicas de las parejas. Tere y Víctor, gracias por vuestro orden en la recogida de los datos de laboratorio sin los cuales habría sido imposible realizar la Tesis. Javier, gracias por tu estricta randomización de los casos.

A mi madre, por su entrega y dedicación diaria a nuestra familia.

A mi padre y Director de Tesis, por su ejemplo de vida, tanto a nivel personal como profesional. Esta Tesis Doctoral ha sido resultado de su gran motivación y conocimiento. Gracias por tu ayuda incondicional.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ÍNDICE

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

Índice	3
Abreviaturas	9
INTRODUCCIÓN	13
Capítulo 1. TERMINOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN	15
Capítulo 2. HISTORIA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA.....	20
Capítulo 3. EPIDEMIOLOGÍA Y DEMOGRAFÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA.....	26
3.1. Historia de la fertilidad en España.....	27
3.2. Situación actual de la demografía mundial.....	31
3.3. Situación demográfica actual en España.....	35
3.4. Cambios sociales	38
3.5. Epidemiología de la esterilidad en la actualidad.....	45
Capítulo 4. ESTERILIDAD DE CAUSA MASCULINA.....	48
4.1. Etiología.....	49
4.2. Esterilidad idiopática.....	57
4.3. Diagnóstico.....	58
4.4. Importancia del Seminograma.....	59
4.5. Capacitación Espermática.....	66
4.6. Evaluación alteraciones seminales.....	69
Capítulo 5. ANATOMÍA DEL APARATO GENITAL MASCULINO	71
Capítulo 6. EL ESPERMATOZOIDE.....	78
6.1. Estructura del espermatozoide.....	78
6.2. Espermatogénesis.....	81
6.3. Fenómenos espermáticos para conseguir capacidad fecundante	84

6.4. Composición de la membrana plasmática.....	88
Capítulo 7. EL SEMEN.....	91
7.1. Órganos que participan en la elaboración del semen.....	91
7.2. Composición química del plasma seminal.....	92
Capítulo 8. ESTILO DE VIDA Y ESTERILIDAD.....	94
Capítulo 9. ESTRÉS OXIDATIVO.....	100
9.1. Introducción.....	100
9.2. Radicales libres (RL).....	102
9.3. Fuentes de RL.....	107
9.4. Toxicidad de los RL.....	109
9.5. Fuentes de Especies Reactivas de Oxígeno en el semen.....	109
9.6. Estrés oxidativo (EO) y esterilidad masculina.....	112
9.6.1. Peroxidación lipídica (PL).....	114
9.6.2. Mecanismo de daño espermático mediado por ERO.....	115
9.6.3. Fuentes de generación de ROS durante las TRA.....	120
9.6.4. Relación de los niveles de EROS y la edad del varón.....	123
Capítulo 10. LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS (AG.....	124
10.1. Lípidos.....	124
10.2. Ácidos grasos.....	125
10.2.1. Ácidos grasos de la serie omega-6.....	128
10.2.2. Ácidos grasos de la serie omega-3.....	129
10.2.2.1. DHA.....	131
Capítulo 11. ANTIOXIDANTES.....	145
11.1. Generalidades.....	145
11.2. Sistema antioxidante.....	146
11.3. Clasificación.....	147
11.4. Fuentes antioxidantes en los alimentos.....	154

Índice

11.5. Sinergismos entre antioxidantes.....	156
11.6. Indicaciones.....	156
11.7. Papel de los antioxidantes en distintas enfermedades.....	157
11.8. Población diana de los antioxidantes.....	161
11.9. Antioxidantes en el varón subfértil.....	164
JUSTIFICACIÓN.....	193
HIPÓTESIS DE TRABAJO. OBJETIVOS:.....	198
Principales.....	202
Secundarios.....	203
MATERIAL Y MÉTODO.....	205
1. ENFERMEDAD A ESTUDIO.....	207
2. LUGAR DE REALIZACIÓN.....	207
3. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	207
3.1. Tipos de pacientes	
4. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	211
4.1. Randomización.....	212
4.2. Medicación en estudio.....	212
4.3. Descripción del plan de tratamiento.....	214
4.4. Número de pacientes y Número de ciclos de TRA.....	216
4.5. Duración del tratamiento del varón.....	218
4.6. Cumplimiento terapéutico.....	218
4.7. Duración del periodo de estudio.....	219
5. METODOLOGÍA DE LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	219
5.1. Seminograma.....	219
5.2. REM o capacitación espermática.....	221
6. METODOLOGÍA DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA).....	222

6.1. Inseminación artificial conyugal (IAC).....	222
6.2. Fecundación in vitro (FIV-ICSI).....	224
7. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS.....	233
7.1. Definiciones	
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES.....	236
8.1. Aspectos eticos (Helsinki) y Marco Legal.....	236
8.2. Confidencialidad.....	238
8.3. Responsabilidad del clínico.....	239
9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	239
10. DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL.....	242
RESULTADOS.....	250
Capítulo 1. Antioxidantes en Varones con Astenospermia Idiopática Leve que precisan de IAC.....	251
1. Parámetros seminales.....	252
2. Parámetros gestacionales. Tasa de embarazo.....	258
Capítulo 2. Antioxidantes en Varones con Astenospermia Idiopática Severa que precisan de ICSI.....	262
1. Parámetros seminales.....	263
2. Parámetros ovocitarios y embrionarios.	269
3. Parámetros gestacionales. Tasa de embarazo.....	273
4. Acontecimientos adversos gestacionales. Tasa de aborto.....	275
5. Características de los nacimientos de los niños nacidos vivos sanos tras IAC e ICSI en todos los grupos de estudio.....	277
DISCUSIÓN.....	279
Capítulo 1. Revisiones sistemáticas y meta-análisis.....	286
Capítulo 2. Resultados a debatir con otros investigadores.....	298

Índice

2.1. Discusión en la valoración de los parámetros seminales y resultados gestacionales en varones subfértiles, tratados con diversos antioxidantes, en parejas que no realizan técnicas de reproducción asistida.....	299
2.2. Discusión en la valoración de parámetros seminales y resultados gestacionales en varoes subfértiles, tratados con dos antioxidantes diferentes, en parejas que si realizan técnicas de reproducción asistida: IAC en casos de astenospermia leve o FIV-ICSI en casos de astenspermia severo.....	325
2.3. Características de los nacimientos y de los nacidos vivos sanos tras IAC e ICSI en todos los grupos controles y antioxidantes.....	357
CONCLUSIONES.....	361
BIBLIOGRAFÍA.....	365
ANEXOS.....	382
Índice de Tablas.....	383
Índice de Figuras.....	385

ABREVIATURAS

1O2	Oxígeno singlete
AA	Ácido araquidónico
ABC	ATP-Binding Cassette
AC	Antes de Cristo
ACCD	Ausencia congénita de los conductos deferentes
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AGPI	Ácido graso polinsaturado
AICR	<i>American Institute for Cancer Research</i>
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido alfa-linolénico
MANCOVA	Análisis Multivariante de la Varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASAP	<i>Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention</i>
ASEBIR	Asociación Española de Biología de la Reproducción
ASESA	Asociación Española de Andrología
AMM	Asociación Médica Mundial
ASRM	Asociación Americana de Medicina Reproductiva
BCPs	Bromocloropropanos
CAT	Catalasa
CMV	Citomegalovirus
COPs	Contaminantes orgánicos persistentes
Co-Q10	Coenzima Q 10
g.l.	Grados libertad
Eta²	eta cuadrado parcial (tamaño del efecto)
CT	Criotransferencia Embrionaria
DBCP	Dibromocloropropano
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DT	Desviación típica
DHA	Ácido docosahexaenoico

Abreviaturas

DMAE	Degeneración Macular asociada a la edad
DRI	<i>Dietary Reference Ingest del Institute of Medicine</i>
ECV	Enfermedad Cerebro Vascular
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ET	Error típico
EMM	Edad media a la maternidad
EO	Estrés oxidativo
EOD	Esterilidad de origen desconocido
EPA	Ácidos eicosapentaenoico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ESHRE	Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana
EURAMIC	<i>European community multicenter study on Antioxidants, Myocardial Infarction and breast Cancer</i>
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FIV	Fertilización in vitro
FSH	Follicle-stimulating hormone
FSHr	Follicle-stimulating hormone recombinante
FSHu	Follicle-stimulating hormone urinaria
G6PDH	Glucosa 6fosfatodeshidrogenasa
GP	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HMG	<i>Human menopausal gonadotrophin</i>
HOPE	<i>Heart Outcomes Prevention Evaluation</i>
HPS	<i>Heart Protection Study</i>
HSG	Histerosalpingografía
HTA	Hipertensión arterial
IA	Inseminación Artificial
IAC	Inseminación Artificial Conyugal
IAD	Inseminación Artificial con semen de Donante
ICC	Insuficiencia cardiaca congestiva

Abreviaturas

ICF	Índice coyuntural de fecundidad
ICMART	<i>Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology</i>
ICSI	Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto Nacional de Estadística
MDA	Malondialdehído
MDSG	<i>Menstrual Disorders and Subfertility Group</i>
MII	Metafase II
MLG	Modelo Lineal General
MORGEN	<i>Dutch Monitoring Project for the Risk Factors for Chronic Disease</i>
MSR	Metionina sulfóxido reductasa
NAC	N- Acetil-cisteína
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NO	Oxígeno nítrico
O2-	Anión superóxido
OAT	Oligo-asteno-teratozoospermia
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OH-	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCB	Bifenilos policlorados
PL	Peroxidación lipídica
PAE	Plan de Análisis Estadístico
PML	Leucocitos polimorfonucleares
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activator receptors</i>
PPP	<i>Primary Prevention Project</i>
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Q	Semiquinona
QH	Ubisemiquinona
REDOX	Reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno
REM	Recuperación de espermatozoides móviles
RL	Radicales Libres
ROO	Peróxido
SG	<i>Screening Genético Preimplantacional</i>
SEF	Sociedad Española de Fertilidad

Abreviaturas

SEGO	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SOD	Superóxido dismutasa
SPACE	<i>Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in End stage renal disease</i>
TDS	Síndrome de disgenesia testicular
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
UR	Unidad de Reproducción
UV	Radiación Ultravioleta
WAS	<i>World Association for Sexology</i>

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. TERMINOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN

La WAS (*World Association for Sexology*) define la *salud sexual* como un estado de bienestar físico, psíquico, emocional y social en relación a la sexualidad, y no solamente la ausencia de enfermedad, disfunción o debilidad. La salud sexual requiere un enfoque respetuoso y positivo hacia la sexualidad y las relaciones sexuales, así como hacia la posibilidad de tener relaciones sexuales placenteras y seguras, libres de coerción, discriminación y violencia (1).

La *salud reproductiva* se define como un estado general de bienestar físico, mental y social, y no de mera ausencia de enfermedad o dolencia, en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo, sus funciones y procesos. Entraña, además, la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos, de procrear y, la libertad para decidir hacerlo o no, cuando y con qué frecuencia (1).

La unión de ambos conceptos, es decir, la salud sexual y reproductiva, tuvo su origen en la Conferencia Internacional sobre Población y Desarrollo de Naciones Unidas, desarrollada en El Cairo en 1994. Su programa de acción incluyó políticas de población cuyos objetivos se basaban en el individuo, en lograr su bienestar y en la mejora de su calidad de vida, dentro del ámbito de los derechos humanos. En concreto, establecía la importancia de la capacidad de decisión de la mujer sobre su salud sexual y reproductiva y su fecundidad, de forma libre y sin coerción, ni violencia ni discriminación (1).

Demográficamente, natalidad y fecundidad son dos conceptos diferenciados. La *natalidad* se refiere a la tasa bruta del total de nacimientos por el total de la población, mientras que *la fecundidad* se reduce a la población de mujeres en edad fértil, aunque la natalidad sea el resultado final de la fecundidad. Ambos términos, fecundidad y natalidad, son un fenómeno demográfico preocupante y de actualidad dada su evolución en las últimas décadas en los países desarrollados. La fecundidad no solo es importante para la reproducción demográfica de la sociedad, sino también por las implicaciones económicas, socioculturales y demográficas que ésta proyecta sobre el individuo o por las

posibles consecuencias sobre el estado de bienestar, o sobre el sistema de pensiones. La natalidad es un fenómeno demográfico que produce cambios sociales por su influencia en la familia, la economía, el trabajo, la vivienda, la sanidad o la educación (2).

La fecundabilidad es definida por la ESRHE como la probabilidad de concepción por ciclo en una pareja que no utiliza métodos anticonceptivos. La tasa de embarazos conseguidos tras el primer mes sin anticonceptivos representa una estimación de la fecundabilidad (3).

La fecundidad es el hecho de dar a luz a un hijo. Es el resultado de una conducta: el estado de embarazo. Es una noción individual o de pareja, con un concepto de tiempo ineludible: la tasa de fecundidad está limitada por la duración de la vida fértil (3). La ESRHE la define como la capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito.

Por *infecundidad*, se entiende la ausencia de nacidos vivos para una mujer, un hombre o una pareja durante un período de tiempo dado. La infecundidad definitiva o total es el hecho de llegar al final de la vida fértil sin haber tenido hijos nacidos vivos. Puede ser voluntaria o involuntaria, asociada a problemas de esterilidad o no.

El término *fertilidad* es de naturaleza polisémica, difiriendo su significado según la naturaleza de la ciencia que lo estudie. Los términos esterilidad y fertilidad no significan lo mismo en medicina de la reproducción y en demografía. Así para la demografía la población fértil es aquella que ha tenido hijos, mientras que el término fertilidad en el sentido reproductivo en demografía se denomina como fecundidad (o capacidad de tener hijos) (4).

La fertilidad es el potencial, la capacidad de concebir. Se trata de una probabilidad, de una noción estadística, individual o de pareja. Es la condición indispensable pero no suficiente para la fecundidad. Presenta importantes variaciones fisiológicas y puede modificarse por causas patológicas. Sobre ella actúan los tratamientos de reproducción, con el fin de lograr la fecundidad. Al contrario que la fecundidad, que es verdaderamente objetivable, la fertilidad no

puede medirse. Se valora por la fecundabilidad, *la capacidad de concebir en un ciclo*, y es tan sólo del 20-30% de media para una población en edad de procrear. Se traduce en un tiempo necesario para concebir, relacionado matemáticamente con la fecundabilidad, que es de 4-6 meses de media ($1/\text{fecundabilidad}$) (3). La ESHRE define *fertilidad* como la capacidad para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito.

La *esterilidad* se define como la incapacidad de una pareja para conseguir un embarazo. La *esterilidad primaria o total* se refiere al hecho de no haber procreado nunca, habiendo existido exposición al riesgo y en ausencia de anticoncepción. La *esterilidad secundaria o parcial* es la que se presenta después de haber ocurrido un nacimiento. Estos dos casos corresponden a esterilidad casi definitiva, es decir que una vez identificada no va seguida casi nunca de un restablecimiento de la fertilidad. La esterilidad pasajera o temporal, en cambio, es cuando un período de esterilidad de la mujer va seguido de una vuelta a la fertilidad.

La Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM), la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), consideran estéril a aquella pareja que no consigue un embarazo después de un año de coitos normales sin usar métodos anticonceptivos, mientras que otras sociedades científicas como la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana (ESHRE) y la propia Organización Mundial de la Salud (OMS) consideran que tienen que haber transcurrido al menos 24 meses (5).

La SEF insiste en que la esterilidad es una enfermedad. El término se ajusta a esta definición porque existe un síntoma, la ausencia de consecución del embarazo, que es consecuencia de una alteración del funcionamiento del aparato genital de uno o ambos conyuges.

El término *infertilidad* es para muchos especialistas, sobre todo del ámbito anglosajón, sinónimo de esterilidad. En el medio hispano hablante, se ha

entendido como infertilidad la incapacidad para generar gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad fetal. Por tanto, este concepto engloba situaciones como el aborto de repetición, la muerte fetal intrauterina, el parto prematuro, etc. En la actualidad, se tiende a preferir el término "pérdida gestacional recurrente" para designar este conjunto de procesos.

El Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, define:

- "concepción" como la acción y el efecto de quedar preñada la hembra.
- "esterilidad" como enfermedad caracterizada por la falta de aptitud de fecundar en el macho y de concebir en la hembra.
- "infertilidad" como sinónimo de esterilidad.

Si bien en la terminología española hasta hace unos años se diferenciaba entre esterilidad (o dificultad para conseguir el embarazo) e infertilidad (dificultad para conseguir que los embarazos concluyeran en recién nacidos), en la actualidad el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española los considera como sinónimos.

Si recurrimos al diccionario de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales define:

- "esterilidad" como la incapacidad para producir gametos funcionales o cigotos viables.
- "fertilidad" como antónimo de esterilidad.

Esta definición tampoco complacería pues dejaría sin contemplar muchas patologías reproductivas.

Distinguimos entre *esterilidad absoluta* y *subfertilidad*. La *esterilidad absoluta* correspondería a las parejas en las que hay un impedimento total para la consecución del embarazo. Frente a ello se encuentra la *subfertilidad* o esterilidad relativa. Se trata de parejas en las que está presente un impedimento parcial en su fecundidad, en las que existe algún problema que

Introducción

determina que su fecundidad sea más baja de lo normal, pero no nula (4). La ESRHE define subfertilidad como la capacidad para conseguir embarazo sin ayuda médica pero en un periodo superior a un año.

CAPÍTULO 2. HISTORIA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

Se han promulgado las teorías más diversas para explicar el mecanismo de la procreación desde la Antigüedad, muchas de ellas son expresadas en forma de mitos y leyendas. Un ejemplo lo constituye el *Taoísmo*, implantado en China desde hace más de dosmil años. En esta doctrina, basada en el equilibrio entre el Yang (fuerzas positivas) y el Yin (fuerzas negativas), la secreción de la mujer se considera el Yin y el semen como el Yang; su unión se produce durante el coito, lo que capacita a la “semilla” masculina para posteriormente entrar en la mujer y transformarse en el feto (6).

Los *Egipcios* (3200-2000 a.c.) desarrollaron métodos para el diagnóstico de las mujeres infértiles. No obstante, sabían que no todos los casos de infertilidad eran de origen femenino. Los exámenes que realizaban se basaban en el concepto de que los órganos genitales estaban en continuidad con el resto del cuerpo y, en particular, con el tracto digestivo en mujeres fértiles. Esta idea se mantuvo hasta la Edad Media, pero no proporcionaron los egipcios ningún tratamiento de fertilidad satisfactorio que conozcamos a día de hoy (7).

La *civilización Hebrea*, fue una de las principales fuentes de conocimiento, relacionada con la medicina Judía a través de la Biblia. “Ser fructíferos, multiplicaos, y repoblar la tierra”, es la orden de Dios a Adán y Eva al comienzo del Libro del Génesis. En este contexto se puede entender que la infertilidad fuera un castigo divino, al tiempo que la infertilidad masculina no fuera reconocida. Sin embargo, Dios podría privar de descendientes a una pareja para castigarles de un pecado. Esto le pasó a Conías, el cual fue maldecido y privado de descendencia cuando llegó a ser rey de Judea (Jeremías 22,30). En el Libro del Génesis (Génesis 30,2), cuando Jacob se enfada con su mujer Raquel, él dice: “¿soy yo acaso Dios, que te impidió el fruto de tu vientre”. Pero sobre todo el embarazo es un regalo del Señor. Eva dice: “Yo he recibido un hombre del Señor” (Génesis 4,1). En el Antiguo Testamento varios versos cuentan la historia de la mujer infértil que concibió gracias a la intervención divina: por ejemplo, Sara la mujer de Abraham (Génesis 20,18) o Rebeca la

mujer de Isaac (Génesis 25,21), o en el Nuevo Testamento, Isabel, la mujer de Zacarías (Lucas 1,5-24) (7).

La *medicina occidental* encuentra sus primeras bases en Grecia. El cambio realmente importante vino con *la escuela de Hipócrates*, que nació alrededor del año 460 a.c. Hipócrates describió la semilla como “el jugo de todas las partes del cuerpo”, procediendo de la médula espinal, pasaría por los riñones y por los testículos hasta llegar al pene. La mujer también produciría una semilla más débil, de manera similar, por lo que ambos padres aportarían una parte igual a la formación de un nuevo ser. El placer sexual era necesario para que todas las partes del cuerpo participaran del coito, y, sólo cuando los dos “líquidos seminales” se encontraban en determinadas cantidades, se formaba el feto (6). Para Hipócrates la infertilidad podría deberse a distintas causas: mala posición del cérvix, debilidad de la cavidad interna debida a un origen congénito o adquirido subsecuentemente a una cicatrización tras úlceras, la obstrucción del orificio uterino debido a una amenorrea, un flujo menstrual excesivo y el prolapso uterino. Los tratamientos eran numerosos: “Cuando el cérvix está demasiado cerrado el orificio interno debe ser abierto mediante una mezcla especial compuesta por nitro rojo, comino, resina y miel” (7).

La mayoría de los pueblos primitivos asociaban la relación sexual con la gestación y el nacimiento, pero desconocían el mecanismo del proceso. *Aristoteles*, hace unos 2500 años, creía que la reproducción se ocasionaba por un coágulo de sangre menstrual presente en el útero que era animado por un principio estimulante presente en el semen. Esta idea (*teoría vitalista*) perduró hasta 1650, cuando W. Harvey, tras numerosas observaciones en animales, concluyó que no era un coágulo sino el ovulo el que era vitalizado por el fluido seminal.

Las primeras disquisiciones sobre el origen del poder procreador del hombre provienen de *los sumerios*; atribuían a la saliva, vehículo del soplo de la vida, un poder procreador a la vez material y mágico. En la Grecia Antigua, *Galeno* estudió los testículos, preconizó que el semen procedía del filtrado de la sangre y que un hombre podía eyacular sin ser fértil. La relación entre la ausencia de

testículos y la infertilidad fue reconocida por el empleo a lo largo de toda la Historia de los eunucos como guardianes de harenes o de alcoba, especialmente en Oriente Medio y China (6).

En la *escuela árabe* (700-1200), el médico más afamado y prestigioso fue Avicena (980-1037). Para él, la infertilidad podía tener un origen masculino o femenino, relacionado con una anomalía de los “espermatozoides” producidos por el hombre o la mujer. También podía deberse a una anomalía del tracto genital o problemas psicológicos (melancolía) (7).

En la *época medieval* la procreación se consideraba necesaria, de hecho Santo Tomás de Aquino (1225-1274), dijo que “la naturaleza busca la generación de descendientes para preservar el bien de las especies”. Los médicos en la Edad Media utilizaron distintas recetas para diagnosticar el origen de la infertilidad. Una de éstas, inspirada en los Egipcios y adoptada por el médico Arnau de Villanova (1240-1311), consistía en insertar un diente de ajo en la vagina, si el olor se transmitía a la boca de la mujer, entonces era fértil. La medicina medieval se basaba en la Griega, tanto en sus conceptos fisiológicos como en los métodos de diagnóstico y tratamiento. Esto desembocó en un estancamiento del conocimiento, así como del estatus social de la mujer. Los tratamientos sobre la infertilidad estaban más cercanos a los ritos o las costumbres, y no fue hasta el Renacimiento cuando los avances en anatomía y ciencias médicas proporcionaron ideas y tratamientos para un progreso real (7).

El *Renacimiento* marca un periodo de progreso científico. Vesalio publicó en 1543 su conocido “*Humani Corporis Fabrica*”, el cual incluye secciones anatómicas de los órganos genitales femeninos. Bartolomeo Eustachio dibujó el útero y sus vasos y recomendaba a los maridos que tras el acto sexual metieran el dedo en la vagina para favorecer la concepción. Este fue el ancestro de la idea de inseminación artificial. Ambroise Paré (1517-1590) defendía la dilatación del cérvix para el tratamiento de la infertilidad y fue el primero en seccionar un septo vaginal en una mujer infértil (7).

En el *siglo XVIII* el razonamiento médico sufrió una completa transformación y a partir de ese momento comenzó el *método científico*. Van Leeuwenhoek en 1677, y Hamm, fueron las primeras personas que visualizaron espermatozoides, a los cuales llamaron “animálculos” (7).

El anatomista alemán Martin Naboth en 1707 publicó su tratado de infertilidad, “*De Sterilitate*”, en el cual mantiene que la esclerosis ovárica y los bloqueos tubáricos podrían ser causa de infertilidad. En 1752, el padre de la obstetricia inglesa, William Smellie, fue el primero en llevar a cabo experimentos y describir el proceso de fecundación y sugirió la leucorrea como posible causa de infertilidad. A pesar de los avances obtenidos, la infertilidad se atribuía a la mujer (7).

En 1769 en un trabajo titulado “*The Seats and Causes of Diseases*”, el anatomista Giovanni Battista Morgani, sumó otras posibles etiologías a la infertilidad y esterilidad como: ausencia o agenesia folicular, anomalías de la vagina o de los órganos genitales externos, aplasia uterina y derivaciones del útero.

La *primera inseminación con éxito en mamíferos* fue llevada a cabo por el médico y sacerdote italiano Lázaro Spallanzan en 1784 en perros, y la hembra tuvo tres cachorros 62 días después. Hacia 1785 el cirujano escocés John Hunter realizó los primeros intentos de *inseminación artificial humana*, resultando en el nacimiento de un niño sano ese mismo año. El caso consistía en un comerciante adinerado de tejidos que presentaba hipospadia, al cual Hunter le propuso recoger su semen en una jeringa caliente e inyectarlo en la vagina de su mujer (7).

En el *siglo XIX* se dieron varios pasos decisivos en el campo de la infertilidad y la esterilidad. Marion Sims, publicó en 1866 su principal tratado llamado: “*Clinical Notes on Uterine Surgery with Special Reference to the Management of the Sterile Condition*”. En este trabajo explica que la infertilidad y la dismenorrea tienen un origen común, la estenosis cervical. Así pues, recomienda que la esterilidad se debía tratar dilatando el cérvix, bien usando

dilatadores o quirúrgicamente, realizando una incisión en el mismo. También pensaba que la mala posición uterina contribuía a la infertilidad, pero prefería métodos clásicos (pesarios) para tratarla, dejando la cirugía para los casos más extremos. En 1868 publicó "*The Microscope as an Aid in the Diagnosis and Treatment of Sterility*", en el que defiende el papel fundamental que juega el examen bajo el microscopio de la calidad espermática para entender la infertilidad (7).

En el año 1884 en Filadelfia se produjo el primer caso confirmado de *inseminación artificial de donante* (IAD), llevada a cabo por William Pancoast en el Jefferson Medical College (7).

Durante la primera y segunda década del *siglo XX* empezó a desarrollarse la endocrinología reproductiva y ya se utilizaron gonadotrofinas para realizar estimulaciones e inducciones ováricas. En 1929 es el primer año en el cual se realizan recuentos espermáticos. A partir de esta época ya empiezan a desencadenarse una sucesión frenética de avances en medicina reproductiva que será imparable y muy prolífica hasta nuestros días (7).

En Estados Unidos, en 1930, Rubin usó su test de insuflación tubárica para diagnosticar obstrucciones tubáricas. En 1944 se crea la Sociedad Americana de Fertilidad (ASF) y el equipo de John Rock en Harvard comunica uno de los avances más importantes en medicina reproductiva, la fecundación in vitro (FIV) de ovocitos humanos. En 1951 tiene lugar la primera transferencia satisfactoria de embriones bovinos y se descubre la capacitación espermática. En los años 60 se inicia un cambio de la sociedad y se acepta la pareja como concepto en el estudio de la fertilidad, aspecto importantísimo en el concepto de esterilidad como problema de pareja, dando así importancia al factor masculino. En los años 70, urólogos españoles, el Dr. Puigvert junto con el Dr. Pomerol Serra, unen esfuerzos con otros médicos e investigadores para crear el 1^{er} Curso Internacional de Infertilidad Masculina. Este fue el embrión de lo que hoy es la "*International Society of Andrology*".

La Asociación Española de Andrología (ASESA) fue fundada en el año 1980. La urología se estaba preocupando por otras líneas y se necesitaba que la figura del médico especialista en fertilidad en el varón tuviera un espacio común. Nació la figura del Andrólogo, con unos objetivos que perduran en la actualidad:

- Fomentar el estudio, exploración, investigación y análisis de cualquier aspecto que haga referencia a las funciones sexuales y reproductoras masculinas.
- Desarrollar el conocimiento y divulgación de la andrología.

La creación y organización de los bancos de semen surge en Barcelona, por iniciativa de Simón Marina, organizando en 1977 el primer banco de semen de España. El 14 de enero de 1978 se efectuó la primera inseminación artificial con semen de donante (IAD) con semen congelado. Una vez puesto en marcha el banco de semen, el Instituto Dexeus consigue en el año 1978 el primer nacimiento después de inseminación artificial por semen de donante (IAD).

Robert Edwards (Premio Nobel de Medicina año 2010) y Patrick Steptoe consiguieron un hito histórico, el nacimiento el 25 de julio de 1978 de Louise Brown, la primera niña del mundo conseguida tras Fecundación "*in vitro*" en Bourn Hall, Londres. A este primer éxito siguieron muchos entre ellos los de los grupos australianos de Lopata, Wood y Trounson que consiguen el año 1980 el nacimiento de la primera niña australiana tras FIV. Este éxito de la técnica llega a nuestro país y así el 12 de julio de 1984 nace mediante cesárea, Victoria Anna, primer bebe conseguido tras FIV en el Instituto Dexeus en Barcelona.

CAPÍTULO 3. EPIDEMIOLOGÍA Y DEMOGRAFÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

La demografía se interesa por la dinámica poblacional, es decir el crecimiento o decrecimiento de una población dada, su movilidad y las causas que favorecen o inhiben estos procesos. Los incrementos provienen de los nacidos vivos y de los inmigrantes y los decrementos, de las defunciones y de los emigrantes. La preocupación gira en torno al "*nivel de reemplazo de la población*".

El siglo XX se ha caracterizado por un creciente control de la fecundidad, es decir, los individuos deciden tener o no tener hijos. Por una parte el desarrollo de los métodos anticonceptivos permite aplazar los nacimientos hasta el momento en que se deseen los hijos; por otra parte la medicina preventiva y curativa, permite que estos procesos reproductivos sean más exitosos. Por otra parte, las técnicas de reproducción asistida han logrado nacimientos provenientes de individuos o parejas que en otros momentos de la historia habrían sido definitivamente estériles. Al mismo tiempo, el aplazamiento en el inicio de la maternidad ha llevado a que ésta recaiga en etapas del período fértil en el que la mujer es menos fecunda, con lo cual puede haber una tendencia a que aumente la frecuencia de mujeres o parejas con dificultades para concebir o para llevar un embarazo a término.

Uno de los principales problemas en el análisis de la esterilidad es que no hay estandarización de conceptos y menos aún un registro estadístico que permita su medición. Entre las personas que terminan su vida fértil sin hijos habrá algunas que sean infecundas por esterilidad y otras por razones sociales como que nunca se casaron o porque no quisieron tener hijos. Así, la mayor parte de los análisis se realizan con variables de aproximación al problema, lo cual nos enfrenta a gran cantidad de conceptos que va desde la infecundidad, infertilidad, esterilidad, subfertilidad y otros más, hasta la esterilidad definitiva.

3.1. HISTORIA DE LA FERTILIDAD EN ESPAÑA

A principios del siglo XX, el *indicador coyuntural de fecundidad* (ICF), estaba por encima de los cuatro hijos por mujer. En aquel momento, la baja esperanza de vida era responsable de que el crecimiento de la población fuera relativamente moderado. Más tarde, la guerra civil provocaría un brusco descenso, pero pasada la misma, se produjo una intensa, aunque corta, recuperación, en 1940. Los esfuerzos para recuperar los nacimientos perdidos durante la guerra, eran contrarrestados por las pésimas condiciones económicas y las frecuentes crisis, y de ello quedó constancia en la evolución irregular que hasta mediados de los cincuenta tuvo la fecundidad. A partir de entonces y hasta principios de los setenta, ésta iniciaría un largo periodo de recuperación, con un “*babyboom*” a mediados de los años sesenta, que llegaría con diez años de retraso con respecto a los otros países occidentales europeos. Este periodo de gran fecundidad, se producía justo cuando en los países del norte y centroeuropeos, comenzaba un significativo descenso de la misma (2).

A partir de 1975, comenzaría en nuestro país un dramático descenso de la fecundidad, que acabó reduciendo en 25 años el ICF en dos hijos (de 3,3 hijos en 1974 a 1,23 a final del siglo XX), situándolo en 1984 por debajo del índice de reemplazo generacional. Este descenso se mantuvo sin interrupción hasta el año 1998 en el que ICF llegó a ser solo de 1,15 hijos por mujer. Sería a partir de entonces cuando se iniciaría un proceso de recuperación hasta alcanzar 1,24 hijos por mujer en el 2001.

Esta evolución se corresponde con la descrita por la *teoría de la transición demográfica* (1944), que explica el descenso de la fecundidad como consecuencia de una mejora en la eficacia del sistema reproductivo de la población (disminución de la mortalidad y de la fecundidad), fruto de un proceso de modernización y mejora de las condiciones de vida de la sociedad, y que concluye con un estado final de equilibrio demográfico con crecimiento natural moderado o próximo a cero.

Según esta teoría, después de una primera fase de declive poblacional, se produce una segunda fase con un rápido crecimiento transicional y, por último, una tercera más eficiente y con un fuerte potencial de crecimiento marcado por la evolución de la mortalidad y fecundidad.

La primera fase es la que corresponde a los principios del siglo XX, cuando la duración media de la vida en España y Europa apenas era superior a 40 años y la mortalidad infantil estaba entre el 10-20%. La consecuencia a esta situación era una respuesta compensadora que originaba alta natalidad por la desaparición de los primogénitos muertos durante la primera infancia. Desde el punto de vista del comportamiento, a las parejas solo les importaba el número de hijos supervivientes, de aquí que en la mayoría de los casos el número medio de hijos por mujer era del orden de 4.

La segunda fase, ocurre tras la posguerra, cuando a principios de la segunda mitad del siglo XX mejoran la economía y las condiciones de vida y salubridad de la población. Estos cambios iniciaron un periodo prolongado de descenso de la mortalidad que desencadenó la transición, caracterizada por un fuerte crecimiento de la población, consecuencia de una mortalidad en descenso y de una natalidad aún alta. La limitación de los nacimientos quedó compensada por una mejora de la supervivencia de la población joven.

La tercera fase postransicional, reproductivamente más eficiente, debería haber alcanzado una situación de equilibrio poblacional, a expensas de niveles bajos de mortalidad y fecundidad. Sin embargo, esa situación de equilibrio no se produjo tras completar la segunda fase, y de hecho, desde finales de los setenta comienza a hablarse de la necesidad de un nuevo marco teórico, que se conoce como "*segunda transición demográfica*". Las condiciones políticas de la España de Franco, con un fuerte control sobre los procesos de cambio social, retrasó la transformación hacia el nuevo régimen de fecundidad existente en la Europa más desarrollada, pero cuando ésta se produjo, el descenso ocurrió con una mayor velocidad e intensidad.

La natalidad fue el principal responsable del periodo de crecimiento poblacional en más de 100.000 personas entre 1950-1964. Durante esta etapa se produjo un crecimiento sostenido del número de nacimientos y una estabilización de las defunciones. Entre 1964-1976, los nacimientos disminuyeron de forma suave al principio, para estabilizarse posteriormente. Pero entre 1975 y 1996, el número absoluto de nacimientos en España cayó drásticamente de 669.378 a 362.626, una disminución de más de 306.000 que representó un desplome de casi un 46% respecto al nivel de 1975. Aunque en el año 1998 comenzaría una leve recuperación, en 2009 aún estábamos con casi 175.000 nacimientos menos que en 1975.

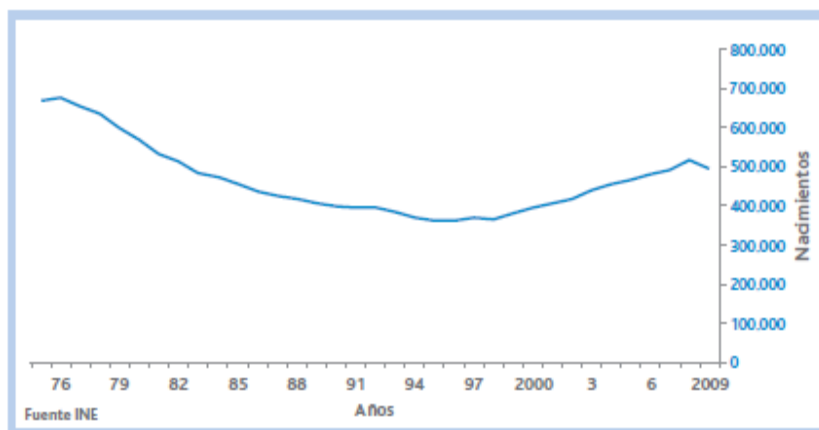


Figura 1. Tasa bruta de natalidad en España (1995-2009)

Evolución de la natalidad en España (1975-2014).

A partir de 1975 se produjo el descenso de la fecundidad que acabó reduciendo en el último cuarto de siglo el ICF en más de dos hijos (de 3,3 hijos en 1974 a 1,15 en 1998). Durante este siglo XXI, el ICF ha ido aumentando desde el 1,23 del año 2000, hasta el 1,45 alcanzado en 2008, sin embargo en los últimos años se ha experimentado un nuevo retroceso, siendo el ICF en 2014 de 1,32.

Índice coyuntural de fecundidad (1975-2010)

Gracias a los elevados índices de fecundidad hasta 1976, la población en edad de tener hijos es todavía lo bastante importante como para compensar la

Introducción

escasa fecundidad media. Sin embargo, en las tres últimas décadas, las parejas han decidido retrasar el calendario asociado al nacimiento de sus hijos, lo que ha supuesto un incremento en la *edad media de la maternidad* (EMM).

La EMM, (considerando el total de hijos tenidos por una mujer) que en 1975 estaba por debajo de los 29 años, disminuyó hasta alcanzar valores mínimos a finales de la década de los setenta y comienzo de los ochenta, con una media de edad de 28,2 años, sin embargo sería a partir de aquí cuando se iniciaría un continuo incremento. Durante la década de los 80, el incremento fue suave y la EMM se incrementó en poco más de medio año. Entre 1990-1995, el crecimiento fue tan intenso que en solo cinco años se elevó la edad media en más de un año. Entre 1995-2000, el ritmo es ya menos fuerte que en el quinquenio anterior, y llega a una edad media muy próxima a los 31 años. En 2010 fue la EMM de 31,12 años, aumentando en 2014 hasta 31,77 años.



3.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA DEMOGRAFÍA MUNDIAL

El Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Población de Las Naciones Unidas en 2014 realizó un informe de la situación demográfica en el mundo, al que voy a referirme a continuación.

La población mundial alcanzó 7.200 millones en 2014, y se espera que para 2050 habrá aumentado más de 2.000 millones. La mayor parte del crecimiento de la población se producirá en las regiones menos desarrolladas. Existe una diversidad considerable en la trayectoria prevista de los cambios que afectarán a la población entre las regiones principales y los países, que obedece en principio a diferencias en los niveles y las tendencias de la fertilidad. La población de África y de Asia aumentará en gran medida en las próximas décadas. Por otra parte, se espera que varios países experimenten un descenso de población debido a la persistencia de índices de fertilidad por debajo de la tasa de reemplazo. En el informe se concluye que la situación actual de la población mundial se caracteriza por una diversidad y un cambio sin precedentes, que se concretan en nuevos patrones de fertilidad, mortalidad, migración, urbanización y envejecimiento.

Tamaño y crecimiento de la población.

En 1994, cuando la comunidad internacional se reunió en El Cairo en la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo, se calculaba que el planeta estaba habitado por unos 5.700 millones de personas. En ese momento la población se incrementaba en casi 84 millones de personas al año. Según las proyecciones realizadas por las Naciones Unidas en aquel entonces, se esperaba que la población del mundo crecería 87 millones al año durante los siguientes 25 años.

En 2014, la población mundial ya ha superado la cantidad de 7.000 millones, alcanzada en 2011, si bien para llegar a esa cifra se ha tardado algo más de lo previsto en 1994, debido a que el crecimiento de la población a lo largo de los

últimos 20 años ha sido ligeramente más lento de lo esperado. Entre 2010 y 2014, la población del mundo aumentó a una tasa anual del 1,2%, considerablemente por debajo del 1,5% anual, que se registraba en la época de la Conferencia de El Cairo. A principios de 2014 se calculaba que la población mundial era de 7.200 millones de personas, que se incrementaba en unos 82 millones de personas cada año, y que más o menos la cuarta parte de este crecimiento se producía en los países menos adelantados. De mantenerse la trayectoria actual, la población mundial alcanzará 8.100 millones en 2025 y 9.600 millones en 2050.

Se espera que para 2050 la población mundial aumente 49 millones de personas al año, más de la mitad de las cuales vivirán en los países menos adelantados. En la actualidad, de los 82 millones de personas que se suman cada año a la población mundial, el 54% corresponde a Asia, y el 33% a África. No obstante, para 2050 más del 80% del aumento mundial tendrá lugar en África, y solo un 12% en Asia. En cifras globales, está previsto que la tasa de crecimiento de la población mundial descienda al 0,5% en 2050.

Fertilidad, matrimonio, formación de uniones consensuales y planificación familiar.

En 1994, cuando la comunidad internacional se reunió en El Cairo, la fertilidad en el mundo había pasado, en cifras globales, de unos 4,5 hijos por mujer a principios de los años 1970 a unos 3 hijos por mujer. La reducción había sido más acusada en Asia y en América Latina y el Caribe, mientras que la tendencia acababa de empezar en África.

En 2014, la fertilidad del mundo se sitúa en cifras globales en torno a 2,5 hijos por mujer. Tras la Conferencia de El Cairo de 1994, la fertilidad bajó en la mayoría de las grandes zonas del mundo, con la destacada excepción de Europa, donde los niveles de fertilidad repuntaron ligeramente en varios países.

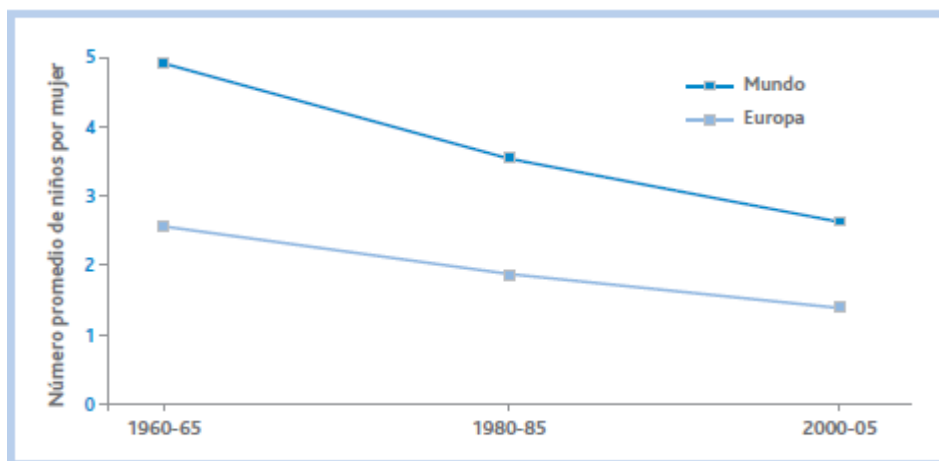


Figura 2. Niveles de fertilidad global (nacimientos por mujer), todo el mundo y zonas principales, 1970 a 2015.

En muchos países de Europa se ha registrado un ligero aumento de la fertilidad durante los cinco a diez últimos años, aunque en muchos casos ello no ha bastado para alcanzar el nivel de reemplazo. Los países de Europa occidental, como Austria y Alemania, y la práctica totalidad de los países de Europa oriental y meridional, seguían teniendo niveles de fertilidad inferiores a 1,5 hijos por mujer en 2014. Las implicaciones demográficas a largo plazo de esos niveles de fertilidad persistentemente bajos varían, ya que algunos países de Europa están recibiendo inmigrantes en edad de trabajar, lo que compensa parcialmente el déficit de nacimientos, mientras que otros países, principalmente de Europa Oriental, se enfrentan a una baja fertilidad, combinada con la emigración de los jóvenes, lo que redundaría en el descenso de la población. A lo largo de este período, la fertilidad en los países de Asia, Oceanía y América Latina y el Caribe se ha seguido reduciendo hacia el nivel de reemplazo o por debajo de este.

La edad del primer matrimonio o de la primera formación de una unión, es por lo general un factor clave para determinar cuándo empiezan las mujeres a tener hijos. Desde la Conferencia de El Cairo, el aplazamiento del matrimonio y de la formación de uniones consensuadas ha contribuido a que ascienda la edad en que las mujeres tienen el primer hijo. El aumento más acusado de la edad a la que se contrae matrimonio ha tenido lugar en Europa, donde en algunos países, como Noruega, Reino Unido e Irlanda del Norte, la edad en

que las mujeres contraen matrimonio se ha retrasado más de 2,5 años por decenio. En América del Norte, Europa, Australia y Nueva Zelanda, la cohabitación ha sustituido en cierta medida al matrimonio entre los jóvenes. En África septentrional y en Asia oriental, el aplazamiento del matrimonio hasta una edad más tardía no ha llevado aparejado un aumento de la cohabitación. Al mismo tiempo, la proporción de hombres y mujeres que se han casado en alguna ocasión ha descendido en todas las regiones principales del mundo.

El cambio en los patrones de matrimonio y de formación de una unión consensual, ha debilitado la relación entre matrimonio y nacimiento de los hijos. En los últimos 20 años, los nacimientos fuera del matrimonio han aumentado como proporción del total en muchos países con un nivel de fertilidad bajo e intermedio. Más de la mitad de los nacimientos se produce ahora fuera del matrimonio en Australia y en siete países de Europa, que se han sumado a un grupo de países de América Latina y el Caribe que tradicionalmente han tenido una elevada tasa de nacimientos extramatrimoniales. Por el contrario, este tipo de nacimientos es raro en muchos países de Asia y de África septentrional.

Las medidas encaminadas a fomentar la disponibilidad de anticonceptivos seguros y efectivos y el acceso a los programas de planificación familiar y a la atención a la salud reproductiva han sido esenciales para propiciar la reducción de la fertilidad. En 2013, más del 90% de los gobiernos ofrecieron apoyo, a los programas de planificación familiar, mientras que en 1996 el porcentaje era del 86%. En todas las principales zonas, salvo en África, la prevalencia de los anticonceptivos es, como poco, un 60% más elevada entre las mujeres dentro del matrimonio o de una unión consensuada. Cuando la prevalencia de los anticonceptivos es baja, las tasas de aborto en condiciones poco seguras tienden a ser altas. Según los cálculos, en 2008, en África, 28 de cada 1.000 mujeres de edades comprendidas entre 15 y 44 años recurrieron a abortos de ese tipo, frente a un promedio del 14% en todo el mundo. En 2008, la tasa más elevada de aborto en condiciones poco seguras (un 28% o superior) correspondió a África oriental, central y occidental y a América central y meridional. La práctica de ese tipo de abortos muestra no solo la necesidad de

contar con medios eficaces para prevenir el embarazo, sino también para mejorar el acceso a servicios para abortar en condiciones de seguridad.

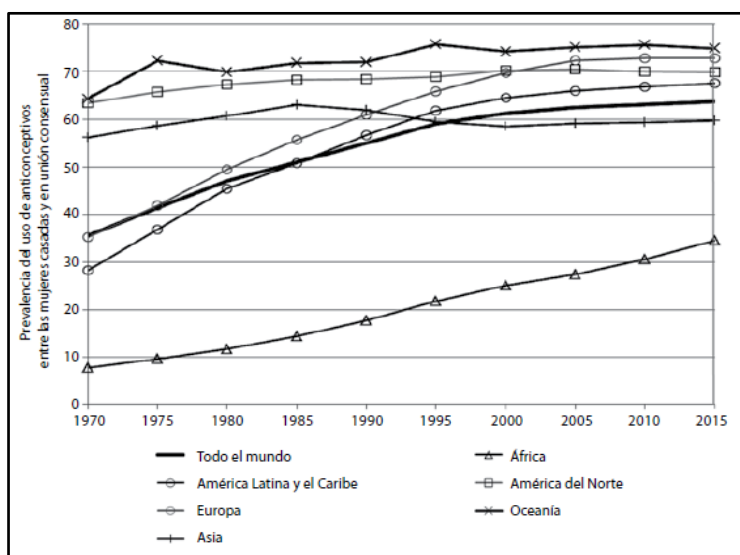


Figura 3. Niveles de prevalencia de los anticonceptivos (porcentaje) entre las mujeres casadas y en unión consensual, todo el mundo y regiones principales, 1970 a 2015.

En resumen, el actual panorama demográfico se caracteriza por una notable diversidad y por los cambios en curso, que se plasman en nuevos patrones de maternidad, matrimonio, mortalidad, migración, urbanización y envejecimiento. Por tanto, se espera que el tamaño, la estructura y la distribución espacial de la población mundial sean en el futuro bastante diferentes de como son en la actualidad. El cambio demográfico seguirá generando otros cambios igualmente importantes en el ámbito social, económico, ambiental y normativo, que a su vez influirán sobre este.

3.3. SITUACIÓN DEMOGRÁFICA ACTUAL EN ESPAÑA

Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), durante 2014 nacieron en España 426.303 niños, mientras que en 2008, el número de nacimientos alcanzó su máximo en 25 años que fue de 519.779. En 2014 nacieron 588 niños más que en 2013, es decir un 0.13% de nacimientos más que el año anterior. El descenso de los nacimientos se produce por el efecto combinado de un menor número de mujeres en edad fértil y de una menor fecundidad. Así,

el Índice de Fecundidad (número medio de hijos por mujer) se redujo en 2014 hasta 1,32, frente al 1,44 de 2008.

Evolución de la población en España (1950-2010)

Con ello, la tasa de natalidad (número de nacimientos por cada mil habitantes en un año) se situó en 2014 en 9,14‰, por debajo del 11,30‰ de 2008. Al compararla con otros países se observan cifras similares en Italia, Grecia y Alemania. Reino Unido, Francia, Suecia y Noruega la tienen en 12‰, siendo la de Brasil de 15‰.

Si se compara la tasa de natalidad global en España que es de 9,14‰ respecto a las comunidades autónomas, se observa que son más altas en Melilla 19,333‰, Ceuta 14,19‰, Murcia 11,11‰, Madrid 10,23‰ y Andalucía 9,7‰. Las comunidades con tasas más bajas son Asturias 6,26‰, teniendo Galicia y Castilla León un 7,1‰.

La menor fecundidad se observó tanto entre las mujeres españolas como entre las extranjeras. El número medio de hijos por mujer española descendió en 2011 hasta 1,32, frente al 1,33 de 2010. En el caso de las extranjeras, este indicador se redujo con mayor intensidad, cifrándose en 1,55 frente al 1,64 observado en 2010.

Evolución de la fecundidad en España durante el siglo XX

La *tasa de fertilidad total* representa la cantidad de hijos que tendría una mujer si viviera hasta el final de sus años de fertilidad y tuviera hijos de acuerdo con las tasas de fertilidad actuales específicas por edad. En España en 2014 ha sido de 1,3 hijos por mujer, y se prevé que durante 2015 baje a 1,2. De los 1,44 hijos por mujer de 2008 se pasó a 1,27 en 2013, una de las más bajas del mundo, sin embargo parece haberse recuperado a los 1,32 en 2014. Si se compara con otros países, se observan cifras similares en Grecia, Portugal, Alemania e Italia, siendo las cifras más elevadas en Níger, con una media 7,6 hijos por mujer. El hecho de que España tenga un índice de fecundidad inferior a 2,1 por mujer (*fecundidad de reemplazo*), supone que no se garantiza una

pirámide de población estable, sin embargo según datos de la Fundación Renacimiento Demográfico las mujeres querrían tener 2,7 hijos.

La *edad media de las mujeres que son madres por primera vez*, alcanzó en 2014 un nuevo máximo histórico: 31,77 años, englobando tanto a españolas como a extranjeras residentes en España. La *edad media de maternidad en españolas ha sido en 2014 de 32,27* frente a 29,28 en extranjeras.

Según los datos del Movimiento Natural de Población publicados por el INE muy recientemente, por primera vez en 5 años han nacido en España más niños que el año anterior, aunque estemos hablando solo de 588 bebés, un 0,1% más que en 2013, cuando nacieron 425.715.

Según datos del INE *la natalidad se recupera por primera vez en la Región de Murcia desde que se inició la crisis*. El número de nacimientos en la Región creció en 2014, algo que no pasaba desde 2008. Durante 2014 nacieron 16.265 niños en Murcia, un 1% más que el año anterior. *La Región de Murcia continua siendo durante 2014 la comunidad con mayor tasa de natalidad de toda España, con 11,1 nacimientos por cada 1.000 habitantes frente a los 9,1‰ de la media nacional*. Durante los años de "boom económico", la natalidad se disparó en Murcia por la llegada de inmigrantes. En 2008 se alcanzó el record de partos en la Región: 19.386. Desde entonces el número de nacimientos no dejó de caer. La tendencia se rompió en 2014, pero el repunte no se debe a las madres inmigrantes sino a las autóctonas según dependen los datos del INE. Así, el número de hijos nacidos de familias inmigrantes descienden muy ligeramente (-0,6%), mientras aumentan los partos de mujeres españolas.

En España durante 2014 un total de 158.425 parejas contrajeron matrimonio, un 1,3% más que en 2013, con la *edad media de matrimonio de 36,9 años*. Durante 2014 en la Región de Murcia se formalizaron 4.883 matrimonios, lo que supone un incremento del 10% con respecto al año anterior. Se trata de un incremento muy superior al registrado de media en España (1,3%). La mayoría de los matrimonios fueron civiles (2.896), mientras 1.963 se celebraron por el

rito católico. La *edad media de matrimonio durante 2014 en la Región se situó en los 34,5 años.*

Respecto a los fallecimientos, se incrementaron en 2014 un 1,2% respecto al año anterior. España será en 2050 uno de los países más envejecidos del mundo. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) nos coloca en el segundo puesto en cuanto a porcentaje de personas mayores de 80 años (15%), y en el tercero si miramos a los mayores de 65 años (36%). Solo Japón nos superará. Estos datos no tendrían que ser malos, puesto que indicarían una larga expectativa de vida para nuestra población. El problema es que no será fecunda, al menos en cuanto a hijos se refiere. Las previsiones del INE para 2064 dicen que la franja de edad más numerosa en la población española será la de 85 a los 89 años, frente a la actual de 35-39 años.

3.4. CAMBIOS SOCIALES

Las sociedades de países industrializados como España están experimentando muchos cambios que afectan al funcionamiento económico y social, así como las formas de vida de la población, las cuales repercuten en la decisión y la capacidad de afrontar la maternidad. La competitividad laboral, la lucha por el posicionamiento social y la priorización del bienestar y la calidad de vida, son ejes centrales en el funcionamiento de las nuevas sociedades. La incorporación de la mujer al mercado laboral y el surgimiento de nuevas formas de familia implican la recomposición de las actividades del hogar.

Los cambios culturales, los relativos al mercado laboral así como los factores relacionados con la escasa intervención de los poderes públicos en relación con el sostenimiento de la familia, relegan a la maternidad a un segundo plano, tal como reflejan las tasas de fecundidad en la actualidad. Concretamente las mujeres españolas, debido a las dificultades de mantener niveles adecuados de autonomía personal, parecen haber optado por la "calidad" en vez de la "cantidad" de la familia. Actualmente se antepone la finalización de los estudios, el bienestar, la estabilidad de la pareja, la estabilidad económica,

geográfica, etc., como requisitos para tener descendencia. Ahora parece excepcional que una persona haya planificado su porvenir antes de los 30 años de edad, y aunque sus padres y abuelos también tuvieron que resolver su futuro, las edades no eran las mismas.

Características de la sociedad española:

- *Retraso de la edad de emancipación.*

Segun datos de 2014 del INE, respecto a la forma de convivencia de los jóvenes, uno de cada tres de los 6,35 millones entre 25 y 34 años, todavía no se había emancipado. El 32,8% vive con sus padres o con alguno de ellos. Este porcentaje aumenta al 48,5% entre los más jóvenes, entre 25 y 29. Si los jóvenes no se independizan, no se casan, y si no se casan no tienen hijos.

- *Incremento de la cohabitación, en detrimento del matrimonio tradicional.*

La cohabitación es un factor disuasorio de la maternidad porque este tipo de convivencia de parejas de hecho no suele ser suficientemente estable y sólido.

- *Tendencia al hijo único.*

España ha pasado de ser un país de familias numerosas y extensas, a otro donde predominan las familias pequeñas, o con una sola persona viviendo en el hogar. Aunque estemos en la retaguardia de la fecundidad, no respondemos a los patrones socioculturales que se nos supondría, y a los que sí se ajustan países muy similares al nuestro, como puede ser Italia. En líneas generales, cuando en un país se dan bajas tasas de natalidad, el número de mujeres que deciden no tener hijos es relativamente alto. Pero no es el caso español, donde solo un 13% de las mujeres nacidas en 1965 no han tenido hijos, mientras que en Inglaterra suponen el 20%. Es en la progresión hacia el segundo hijo donde hundimos nuestra tasa de reemplazo generacional porque el 87% de las mujeres españolas tienen hijos, pero cada vez son más las que tienen solo uno. *La tendencia de las familias españolas hacia el hijo único es cada vez más evidente.* El porcentaje de las mujeres con un solo hijo (27,6%) casi cuadruplica el de la generación anterior (7,4%). En el otro extremo, el de las familias

numerosas, su caída bien puede calificarse como desplome. Del 60,7% de mujeres de la generación nacida en los años 40 que ha tenido tres o más hijos, hemos pasado a un 12,5%.

- *Retraso de la maternidad.*

La edad media de las mujeres a la hora de tener el primer hijo ha aumentado a los 32,27 años. Los nacimientos de bebés de madres mayores de 35 años representan el 18% del total.

- *Falta de igualdad de género.*

Más que el reparto milimétrico de las tareas del hogar y del cuidado de los niños, lo que incentiva a las mujeres a ser madre es que se encuentren satisfechas con el equilibrio conyugal de los roles.

- *Calidad mejor que cantidad.*

Con todos estos datos, la conclusión debería ser que España ha sufrido un movimiento pendular, de un extremo a otro, desplazándose ahora hacia un modelo social en el que los niños no son deseados, pero no es así. Las preferencias sobre maternidad indican que la mayoría desean tener al menos 2 hijos, y no el 1,3 que alcanzan de media. Las causas por las que no se cumplen estas expectativas familiares son complejas y variadas. Los estudiosos de la natalidad sostienen que los padres se enfrentan a la disyuntiva de que el coste de los hijos no solo depende de la cantidad sino también de la calidad que puedan darles. Cuando el nivel de confianza en el futuro es positivo y los trabajos son estables, crece la natalidad. En cualquier caso, las crisis no explican por sí solas la caída de la natalidad porque lo que realmente hacen es aplazarla.

- *Cultura antinatalista de la sociedad.*

No tener hijos se ve como una condición de progreso para la mujer, sobre todo para aquellas que tienen vocación de realizarse profesionalmente. En este

sentido, tener hijos se ve como una limitación para la mujer, mientras que tener muchos se ve ya como un grave inconveniente.

- *Anticoncepción, aborto e infertilidad.*

Según señalaba el Centro de Investigaciones Sociológicas en la Encuesta de Fecundidad y Familia de 1995, uno de los motivos más importantes que explicaba el descenso de las tasas de fecundidad en España era el abundante uso de métodos anticonceptivos, empleados por el 60,8% de las entrevistadas casadas. Además, si se añade la esterilización quirúrgica, el porcentaje aumentaba hasta el 81%. El aborto tiene una importancia relativamente menor pero creciente, ya que las tasas de interrupciones voluntarias de embarazo aumentaron de 5,10 por 1.000 mujeres de 15-44 años en 1992 a 7,66 en 2001; en el 97,16% de las ocasiones se atribuía la causa a la salud de la madre, en el 2,57% al riesgo fetal y en el 0,05% a una violación.

- *Incorporación de la mujer al mundo laboral.*

Un factor que con frecuencia se analiza como causa del descenso de nacimientos en nuestro país es la incorporación de las mujeres al trabajo. Junto a la dificultad de acceso al mercado de trabajo, la precariedad laboral y el miedo a perder el empleo por maternidad, son un condicionante añadido a la hora de decidirse a tener hijos.

Aunque la mujer en España tiene una mayor presencia en la Universidad y sus calificaciones suelen ser más elevadas que las de sus compañeros de sexo masculino, esto no se refleja a la hora de acceder a un puesto de trabajo. A pesar de que la tasa de actividad de las mujeres va en aumento gradual y constante y ésta es vital para la economía del país, aún hoy parece que se apuesta por los hombres como mejores candidatos a un puesto de trabajo. Si bien a las mujeres que no logran acceder al mercado laboral se les pueden presentar obstáculos económicos (entre otros, para afrontar la maternidad), a las que consiguen su lugar en el mercado de trabajo les supone una dura apuesta vital el hecho de compatibilizar el tiempo y el esfuerzo del empleo

remunerado con las responsabilidades domésticas y familiares, que tradicionalmente asumen en solitario.

Las mujeres en España, cuentan con tasas de actividad, de empleo y de condiciones laborales, incluidas las salariales, inferiores a la de los hombres. Tienen un menor acceso a la protección social, cuentan con mayores índices de paro que los hombres y asumen mayoritariamente la atención de las responsabilidades familiares.

- *La protección social a la maternidad.*

A pesar de las dificultades, las mujeres se van integrando progresivamente al trabajo remunerado aunque los hombres todavía van accediendo lentamente a la esfera reproductiva. La necesidad creciente de hombres y mujeres de acceder a la ocupación a veces puede hacer olvidar la dedicación a la vida familiar y, por tanto, la contribución al mantenimiento de una sociedad equilibrada. La compatibilidad de ambas tareas pasa o debería pasar por el acceso a ayudas monetarias que permitan a los beneficiarios hacer frente a los gastos que comporta tener una familia, así como por medidas de conciliación de vida laboral y familiar que permitan disponer de tiempo para procurar las atenciones y cuidados familiares sin la pérdida de oportunidades de las mujeres en la vida laboral o el menoscabo de su vida profesional.

Las Administraciones Públicas e instituciones ligadas a ellas, no destacan precisamente por sus ayudas a la maternidad. La prestación por hijo menor en España es de 24,25 euros al mes, frente a los 125 euros que reciben las familias en Noruega, a los 184 euros de Alemania y a los 190 euros de Dinamarca. España es el país de Europa con menos ayudas para la familia y es necesaria la aprobación por parte del Gobierno del Plan Integral de Apoyo a la Familia.

España, frente al resto de los países europeos, no dispone de adecuadas prestaciones de protección social para la maternidad. Las prestaciones de maternidad, en 2014, se redujeron en un 2,66% respecto al año anterior, lo que

equivale a 7.691 prestaciones de maternidad menos. Este descenso sumado al 3,31% del año 2013, y al 7,91% de 2012, suponen un 13,88% de reducción de estas prestaciones, en los últimos tres años, lo que equivale a un total de 43.254 prestaciones de maternidad menos.

En el mejor de los casos, después del período de baja tras el parto, es cuando suelen surgir mayores dificultades para compaginar las obligaciones laborales y el cuidado de la familia. La necesidad de restringir de nuevo las jornadas a unos horarios estrictos hace que el cuidado de los hijos se tenga que derivar a otras personas o entidades durante el tiempo en el que el padre y la madre trabajan. Es difícil contar con las abuelas, cada día menos disponibles, y la necesidad de contratar a una persona o pagar un centro para la atención infantil, supone a las familias un gasto extra a veces difícil de afrontar. A este inconveniente hay que añadir la escasez de centros especializados en el cuidado de menores que hay en España. Las subvenciones por guarderías representan una cantidad claramente insuficiente, destinada únicamente a las familias que demuestran escasez de medios.

- *Redes de apoyo deficitarias.*

El apoyo que se recibe de la familia, los amigos y otras personas allegadas tiene un impacto directo y amortiguador en la salud, especialmente durante el período maternal, que constituye una etapa de grandes cambios y adaptaciones. Hay una evidencia creciente de que la falta de apoyo social se relaciona con un mayor riesgo de enfermar y con una mayor dificultad para recuperarse de trastornos de todo tipo, tiene un efecto directo en el bienestar y la calidad de vida, y puede modular la percepción que tienen las madres de su salud y la de su bebé, así como modificar la frecuencia de petición de ayuda a los servicios sanitarios. Además, la falta de apoyo que experimentan las madres cada vez con más frecuencia, sobre todo en los países desarrollados, parece ser un factor que contribuye a la depresión posparto.

El INE realizó una encuesta de empleo del tiempo 2009-2010 que ha sido actualizada en 2015. Los hombres ocupados dedican más tiempo al día a actividades de ocio que las mujeres ocupadas. La diferencia entre hombres y

mujeres ocupados es ligeramente superior en el tiempo diario dedicado a medios de comunicación (2 horas y 20 minutos los hombres y 2 horas y 2 minutos las mujeres) y en el tiempo dedicado a aficiones e informática (1 hora y 33 minutos los hombres y 1 hora y 16 minutos las mujeres). Los hombres ocupados como segunda actividad de ocio eligen deportes y actividades al aire libre (1 hora y 43 minutos) y como tercera actividad la vida social y diversión (1 hora y 41 minutos). Las mujeres ocupadas también eligen como segunda actividad de ocio los deportes y actividades al aire libre (1 hora y 31 minutos) y como tercera actividad la vida social y diversión (1 hora y 29 minutos). En todos los hogares los hombres dedican más tiempo al día a vida social y diversión, la diferencia más reducida en el tiempo dedicado por hombres y mujeres a vida social y diversión corresponde a los hogares unipersonales y la diferencia mayor corresponde a padre o madre sola, con algún hijo. Los hombres dedican más tiempo al día a deportes y actividades al aire libre que las mujeres en todos los tipos de hogar. La diferencia más reducida corresponde a los hogares de pareja con hijos y la mayor diferencia a otro tipo de hogar.

Hoy día, la falta de tiempo suficiente de las madres para sí mismas, la percepción de que los cuidados a realizar sobrepasan la propia capacidad en cuanto a la cantidad de tareas que deben asumir, así como la incompatibilidad del cuidado de los hijos con otras responsabilidades dentro y fuera de casa o con la vida social, son variables que, sumadas al deficitario apoyo social por parte del sistema formal e informal, añaden un cierto malestar y afectan a la salud y la calidad de vida de las mujeres.

- *Crisis económica.*

Según datos del banco mundial, el desempleo femenino en 2013 en España ha sido del 27,3%, en aumento progresivo respecto a años anteriores (25,6% en 2012, 22,3% en 2011 y 20,7% en 2010). El único país europeo que supera las tasas de desempleo femenino es Grecia que durante 2013 tuvo un 31,3%. Si se compara el desempleo femenino respecto al masculino en 2013 se observa que éste último es menor con un 26%.

El empleo vulnerable definido como % empleo en trabajadores familiares no remunerados y a los trabajadores autónomos con respecto al % de empleo total, ha sido durante 2013 en hombres de un 15% y en mujeres de un 10%, % que ha ido aumento progresivamente en los últimos años.

3.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESTERILIDAD EN LA ACTUALIDAD

La fertilidad está directamente relacionada con la edad de la mujer. Un estudio publicado en *Science* en 1986 desveló que la frecuencia de esterilidad pasaba del 10% entre los 20 y 29 años, al 25% entre los 30 y 39 y al 50% por encima de los 40 años. La fertilidad masculina también disminuye con la edad. En concreto, según datos del Libro Blanco de la Infertilidad, un 23% anual a partir de los 35 años.

Según la OMS, *más de 80 millones de personas en el mundo están afectadas por la infertilidad*. El retraso de la maternidad afecta al 15% de las parejas que están intentando concebir. En parejas fértiles, la posibilidad de embarazo en un mes es del 20%, aumentando a un 93% la probabilidad acumulada de embarazo a lo largo de un año. El factor masculino de subfertilidad supone el 50% del total de los casos, un hombre de cada veinte estará afectado de subfertilidad. Entre el 30-80% de los casos de factor masculino de subfertilidad se debe al daño inducido por los efectos del estrés oxidativo (8).

En España, cerca de un millón de parejas necesitan recurrir a la reproducción asistida para poder ser padres, y es que la infertilidad afecta al 15% de las parejas. Las alteraciones de la capacidad reproductiva son consideradas como una enfermedad, así lo recuerda la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) en su 29º Congreso Nacional en Mayo de 2012.

En los últimos años parece que los datos epidemiológicos reflejan un incremento de los problemas de fertilidad en las parejas, posiblemente derivado de múltiples factores: fisiológicos, ambientales y sociodemográficos.

Según Matorras en el Congreso XXVI de la SEF, estas cifras se tratan de estimaciones imprecisas y difícilmente contrastables. Los estudios demográficos únicamente describen la frecuencia de parejas sin hijos, lo que conlleva un sesgo de infraconstatación (no se contabilizan las esterilidades secundarias, ni las parejas que han adoptado, ni las esterilidades tratadas con éxito) y uno de supraconstatación (se contabilizan las esterilidades voluntarias). La determinación de la frecuencia de esterilidad mediante encuestas comporta la dificultad de que se trata de una faceta que afecta a aspectos muy íntimos de la vida de la pareja, que no son fácilmente comunicables al encuestador. Por otra parte, los estudios de frecuentación médica también tienen su subestimación (accesibilidad de los recursos, dificultad de registrar todos los centros donde se efectúan las consultas, pacientes que se desplazan a otras regiones, y sobre todo por el hecho de que sólo se contabilizan los pacientes que consultan) y su supraestimación (pacientes que consultan en varios centros diferentes, pacientes que proceden de otras regiones).

La infertilidad afecta tanto a hombres como mujeres. Estas contribuyen en un 50%, los hombres en un 30% y ambos en el 20% restante. No se encuentra factor causal en el 60-75% de los casos de infertilidad masculina denominándose, infertilidad masculina idiopática. En este último caso los varones tienen exploración física y pruebas de laboratorio normales. El análisis del semen revela un descenso del número de espermatozoides (oligozoospermia), descenso de la motilidad (astenozoospermia) y pueden encontrarse formas anormales (teratozoospermia). Estas anomalías se conocen como síndrome oligo-asteno-teratozoospermia (OAT) (9).

Entre un 30-80% de los casos de subfertilidad masculina son considerados debidos al daño del efecto del estrés oxidativo sobre el esperma (8).

La tasa acumulada de embarazos en las parejas infértiles con dos años de seguimiento y con oligozoospermia como causa principal de la infertilidad es del 27 %. La edad femenina es la variable aislada más importante que influye en el resultado de la reproducción asistida. En comparación con una mujer de

25 años, la posibilidad de fertilidad disminuye al 50 % a los 35 años, al 25 % a los 38 años y a < 5 % por encima de los 40 años (10).

Cerca del 25% de parejas no consiguen embarazo en el primer año. La mayoría de las parejas con infertilidad siguen sin recibir tratamiento. Existen tratamientos eficaces, pero solo el 56% de las parejas infértiles buscan ayuda, recibiendo asistencia médica el 22%. Son factores clave que contribuyen a estas lagunas, la persistencia de barreras sociales y personales, los escasos conocimientos sobre la fertilidad y un acceso limitado al tratamiento y al reembolso (4).

España es líder en reproducción asistida, este hecho lo avalan datos epidemiológicos, como ha puesto de manifiesto en el V Simposio Internacional de Reproducción Asistida. Los datos subrayan que *España es el tercer país donde más tratamientos de reproducción asistida se realizan al año, con 54.000 ciclos anuales*. Tan solo están por encima Francia y Alemania, dos países en los que, el número de habitantes es mucho mayor que en nuestro país. Además, es posible que el número real de ciclos de reproducción asistida en España sea mayor que el que citan estos datos, basados en el registro de la Sociedad Española de Fertilidad, un registro hasta ahora voluntario, en el que solo participan los centros que así lo desean. Esto ha cambiado recientemente y el Ministerio de Sanidad ha obligado a todos los centros a comunicar sus resultados.

CAPÍTULO 4. ESTERILIDAD DE CAUSA MASCULINA

La infertilidad humana ha sido reconocida como un problema social de salud a nivel mundial. La *infertilidad masculina es considerada como uno de los factores que más contribuyen a la infertilidad de la pareja (35 %)*, estimándose que afecta uno de cada 20 hombres. En conjunción a los factores convencionales que originan la infertilidad masculina como: varicocele, criptorquidia, infecciones, lesiones obstructivas, fibrosis quística, trauma y tumores, se ha identificado una causa de extraordinaria repercusión: el estrés oxidativo (EO). *El EO puede originar daños o deformidades a los espermatozoides y eventualmente infertilidad masculina, estimándose que está presente en un 30-80 % de este tipo de afecciones (11).*

De acuerdo con la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, la infertilidad afecta alrededor de 6,1 millones de personas en Estados Unidos que equivale al 10 % de la población en edad reproductiva. Se ha estimado que la infertilidad está presente en el 15 % de las parejas. Aproximadamente *el 35 %, la tercera parte de los casos, se deben a un factor masculino relacionado en general con una alteración del espermiograma (11).*

La espermatogénesis depende de la interacción de gonadotrofinas, testosterona, genes del cromosoma Y, factores autocrinos y paracrinos intratesticulares, lo que origina espermatozoides en cantidad y calidad normal, que deben encontrar una vía excretora permeable y un medio seminal adecuado producido en glándulas anexas (11).

La OMS en 1999 estableció los parámetros básicos que de forma rutinaria se deben analizar en el estudio de infertilidad para el género masculino, estos son: volumen de eyaculado, concentración de espermatozoides, motilidad y morfología. Aun así, se estima que aproximadamente del 10 al 15 % de los varones estériles presentan parámetros dentro de los intervalos normales. En estos casos el origen de la esterilidad masculina podría deberse a otras causas, entre ellas los defectos en la membrana del espermatozoide, factores

genéticos o ambientales y por tanto no detectables en el espermograma. No obstante, se considera que existe una serie de indicadores que de estar alterados con respecto a los valores normales, alertan o sugieren un daño oxidativo del esperma, entre los que se encuentran: (11)

- Baja movilidad espermática.
- Teratozoospermia.
- Alto índice de células redondeadas en el semen (leucocitos).
- Incremento de la viscosidad del semen.
- Alteraciones de la integridad de la membrana espermática en el ensayo de hinchamiento por osmolaridad.
- Bajo índice de fertilización en los intentos de rutina de fertilización in vitro.
- Baja movilidad espermática después de la incubación con el ovocito.
- Bajo desarrollo de blastocistos en ausencia de factores femeninos claros (edad materna avanzada/reserva ovárica pobre).

4.1. ETIOLOGÍA

En torno al 15 % de las parejas no logran el embarazo en el plazo de un año y solicitan tratamiento médico para la infertilidad. Finalmente, el 5% se queda sin tener hijos en contra de su voluntad. La infertilidad afecta tanto a varones como a mujeres. En el 50 % de las parejas que no tienen hijos en contra de su voluntad se identifica un factor asociado a infertilidad masculina junto con parámetros seminales anormales (12).

Son múltiples las causas que provocan infertilidad en los hombres, existen algunas en que las que hay pleno acuerdo en que son el factor etiológico como en el Síndrome de Klinefelter; sin embargo, con otros hay discusión si son causa probable o solo coincidencias como en casos de varicoceles, infección seminal y exposición a tóxicos.

Es interesante destacar que en los últimos años, el porcentaje de casos de infertilidad sin causa aparente ha aumentado de forma importante y es a lo que

Introducción

se le llama factor idiopático, constituyendo el 31% de los factores asociados a la infertilidad masculina, siendo por tanto el más frecuente (11).

Por su localización, las causas de infertilidad se pueden clasificar en pre, post o testiculares: (11)

A) Pretesticulares:

- Problemas endocrinos, como diabetes y trastornos tiroideos.
- Desórdenes hipotalámicos como el Síndrome de Kallmann.
- Hiperprolactinemia.
- Hipopituitarismo.
- Hipogonadismo .
- Factores psicológicos: Estrés.
- Consumo excesivo de alcohol y drogas.

B) Testiculares:

- Defectos genéticos del cromosoma Y. Microdelecciones en el cromosoma Y.
- Conjunto anormal de cromosomas como en el Síndrome de Klinefelter.
- Neoplasia.
- Fallo idiopático.
- Criptorquidismo.
- Varicocele.
- Trauma.
- Hidrocele.
- Mumps.
- Síndrome de disgenesia gonadal.
- Exposición de los genitales a altas temperaturas.

C) Postesticulares:

- Obstrucción de vías deferentes.
- Infecciones.
- Eyaculación retrógrada.
- Hipospadias.

Esterilidad de causa masculina

- Impotencia.
- Defecto acrosomal.

A continuación vamos a definir algunos de éstos trastornos: (14)

1. Varicocele

La insuficiencia valvular venosa de las venas espermáticas, manifestada por una dilatación del plexo pampiniforme o varicocele, es una causa importante de infertilidad que se presenta hasta en el 40% de los varones infértiles a diferencia de una frecuencia del 15% en la población fértil. Sin embargo, para que el varicocele pueda ser considerado como una causa de infertilidad, debe estar relacionado con alteraciones en el análisis del semen.

Aunque la relación del varicocele con la infertilidad es controvertida, involucra anomalías estructurales de la cabeza del espermatozoide, oligozoospermia, disminución del volumen testicular, reducción de las funciones de las células de Leydig, patología epididimaria y presencia de anticuerpos antiespermatozoides. Estas alteraciones cuantitativas y cualitativas de los parámetros seminales se relacionan con el aumento de la temperatura testicular, la hipoxia local, el reflujo de catecolaminas suprarrenales y el incremento local de productos tóxicos, como los radicales libres, todo lo cual afecta la regulación endocrinológica intratesticular

2. Infección de las glándulas accesorias masculinas

Las infecciones del tracto reproductor masculino son una causa importante de infertilidad masculina. En general, las infecciones de los testículos, epidídimo, próstata y vías urinarias, asociadas con pioespermia, contribuyen un 5% de las causas de infertilidad masculina. En general, estas infecciones pueden producir atrofia testicular, compromiso de las glándulas accesorias u obstrucciones de las vías seminales, además de su relación con fenómenos inmunológicos como consecuencia de la producción de anticuerpos antiespermatozoides, así como incrementos de los niveles de leucocitos seminales y radicales libres. La parotiditis puede producir orquitis después de la pubertad, debido a que la

inflamación testicular severa es contenida por la poco elástica túnica albugínea, conllevando a un aumento de la presión, isquemia y, potencialmente, necrosis

3. *Factor genético*

Las causas genéticas involucran a menos del 5% de los casos, las cuales son más frecuentes cuando el número de espermatozoides es menor de 10 millones por mL, en los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico o en los hombres mayores de 40 años. No obstante, se ha observado que las causas genéticas pueden involucrar aún más casos (alrededor del 24%), cuando los hombres presentan azoospermia u oligozoospermia severa.

La forma más común de trastorno cromosómico numérico asociado a fallo testicular es el síndrome de Klinefelter, caracterizado por retraso mental leve, ginecomastia y azoospermia, por hipogonadismo hipergonadotrópico. En estos casos, cuando se realiza la biopsia testicular se observa hialinización de los túbulos seminíferos, ausencia de espermatogonias e hiperplasia de las células de Leydig. Sin embargo, desde hace tiempo se conoce la existencia de varones azoospermicos con cariotipo normal, pero con deleciones en el brazo largo del cromosoma Y.

Se han observado la presencia de microdeleciones de genes (*AZFa-d*, *DAZ*, *RBM*, *CDY1*) relacionados con la azoospermia. Estas microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y conducen a la disfunción de genes vitales para la espermatogénesis, debido a la pérdida de segmentos específicos de ADN. Se considera que estas microdeleciones del cromosoma Y son la causa genética más frecuente de infertilidad, reportadas entre el 3% al 21% de los varones infértiles, siendo la más común la confinada a la región *AZFc*, que contiene al gen *DAZ*.

Asimismo, el 75% de los hombres con ausencia congénita de los conductos deferentes (ACCD), son portadores del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*). La ACCD es una causa poco frecuente de infertilidad masculina que se puede llegar a presentar en menos

del 2% de los pacientes, implicando el 6% de la patología por azoospermia obstructiva.

4. Factor inmunológico

Las causas inmunológicas constituyen alrededor del 5% de la casuística. En general, los anticuerpos antiespermatozoides afectan la fertilidad de algunos individuos, debido a reacciones de citotoxicidad, aglutinación e inmovilización espermática, o alteración de las reacciones de capacitación o reacción acrosómica.

5. Factor endocrino

Los trastornos endocrinos constituyen menos del 5% de las causas de infertilidad en el hombre. Los casos de hipogonadismo hipogonadotrópico son muy poco frecuentes, representando alrededor del 1% de la casuística total, pero involucran otros factores que comprometen la salud del individuo. A su vez, algunos hombres obesos pueden padecer de infertilidad, al manifestar niveles séricos reducidos de las hormonas luteinizantes, testosterona (T) y globulina sexual fijadora de las hormonas sexuales, asociado a un aumento de la aromatización de la T, que modifica negativamente el ratio T/estradiol. Por su parte, la diabetes mellitus puede provocar disfunción sexual eréctil por neuropatía autónoma simpática, que está directamente relacionada con el control y la duración de la enfermedad.

La hiperprolactinemia se manifiesta en el hombre como un hipogonadismo hipogonadotrópico, debido a que reduce la pulsatilidad de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH). Este hecho refleja una reducción de los niveles de gonadotropinas y andrógenos, lo cual explica las manifestaciones clínicas que se presentan con mayor frecuencia, como son la disfunción sexual y la disminución de la libido. En forma crónica, puede alterarse la espermatogénesis, y presentar ginecomastia y galactorrea.

6. Enfermedades sistémicas

Introducción

El síndrome de Kartagener se caracteriza, estructuralmente, por la ausencia de los brazos internos y externos del axonema y, clínicamente, por infecciones respiratorias recurrentes (bronquiectasia y sinusitis), dextrocardia y esterilidad.

Otras entidades nosológicas que relacionan la infertilidad con las patologías crónicas del tracto respiratorio son el síndrome de Young (similar al síndrome de Kartagener pero sin la afectación cardiaca), y la fibrosis quística, una enfermedad metabólica con patrón de herencia autosómico recesivo, común en la raza aria, caracterizada por azoospermia obstructiva debido a ACCD. Las afecciones renales y otras enfermedades sistémicas pueden comprometer de manera indirecta la fertilidad.

7. Displasia de la vaina fibrosa del espermatozoide

Es una rara causa de infertilidad y de incidencia familiar, que se caracteriza por espermatozoides de baja motilidad. El diagnóstico se realiza por microscopia electrónica y el diagnóstico diferencial es con el síndrome de Kartagener, pues muchos pacientes presentan también bronquiectasia. No es susceptible de tratamiento médico, por lo que está indicado el ICSI. Por otra parte, cuando se afecta el centriolo del espermatozoide, el espermatozoide está desalineado, pero sin pérdida de su capacidad fecundante, aunque no ocurre la singamia y el clivaje.

8. Alteraciones nerviosas de la eyaculación

La eyaculación retrógrada ocurre cuando el esfínter urinario interno del cuello vesical presenta fallos en el momento de la eyaculación, permitiendo el paso del semen a la vejiga. Usualmente, los trastornos eyaculatorios orgánicos se encuentran en pacientes que toman medicamentos antihipertensivos como los bloqueadores adrenérgicos y los que tienen antecedentes de diabetes, esclerosis múltiple, mielitis transversa, lesiones neurológicas postraumáticas de la columna vertebral u operaciones previas como prostatectomía transuretral, simpatectomía lumbar o disección de nódulos linfáticos retroperitoneales.

9. Factor psicológico

La eyaculación precoz, que impide una inseminación vaginal adecuada, puede tener una causa sistémica por esclerosis múltiple o prostatitis, pero la más común es la psicológica. También pueden involucrar causas psicológicas la ausencia de la eyaculación, además de la eyaculación retrógrada. Adicionalmente, muchos hombres presentan reacciones importantes de estrés, desde su inclusión en una consulta de andrología.

10. Cáncer testicular

Se ha observado un aumento de la prevalencia del cáncer testicular en hombres infértiles que se ha asociado a enfermedades genéticas, exposición a gonadotoxinas y otras causas. Por otra parte, la infertilidad masculina es también una forma de presentación del cáncer testicular, que afecta principalmente a los varones jóvenes de 30 a 40 años.

Después del tratamiento se pueden presentar diferentes grados de infertilidad como obstrucciones, desarrollo de anticuerpos antiespermatozoides, ausencia de eyaculación o eyaculación retrógrada, así como compromiso de las células germinales como consecuencia del tratamiento con radio o quimioterapia.

11. Gonadotoxinas

El consumo de tabaco es uno de los factores principales que contribuyen al bajo recuento espermático en hombres. En los fumadores se incrementa en un 48% la concentración de leucocitos en el líquido seminal e incrementa en un 107% la generación de ERO. Los fumadores además presentan una disminución en el contenido de antioxidantes como vitamina C y E en el plasma seminal, lo cual hace más vulnerable el esperma a la oxidación.

El alcohol tiene un efecto inhibitorio directo sobre la biosíntesis de T por las células de Leydig y sobre el metabolismo hepático de los estrógenos. En consecuencia, se producen niveles bajos de T y altos de estradiol en la circulación, por tanto, el alcohol induce efectos directos sobre el espermatozoide, generando una disminución de su motilidad.

El abuso de otras drogas como la marihuana y la cocaína también comprometen la fertilidad.

Introducción

Los varones expuestos a ciertos solventes presentan menores concentraciones de LH, mientras los hombres expuestos a ciertos pesticidas tienen niveles séricos de estradiol elevados, disminución de la motilidad y del cálculo de los espermatozoides con incremento en las formas anormales.

El consumo de esteroides androgénicos o anabolizantes, suprime la producción de testosterona en el testículo, lo que da como resultado una disminución en el número de espermatozoides que puede ser parcial (oligospermia) o total (azoospermia).

Existen numerosos medicamentos que pueden tener un efecto tóxico para la espermatogénesis, ejemplos de estos tenemos: bloqueadores de canales de Ca, cimetidina, ácido valproico, sulfazalazina, ciclosporina, espironolactona, colchicina, nitrofurantoína, alopurinol y algunos quimioterápicos. Otros fármacos como la aspirina y el paracetamol pueden generar también EO al incrementar la actividad de los citocromos P450 y por tanto, pueden amplificar la generación de ERO.

La exposición profesional a determinadas sustancias como el plomo, cadmio, mercurio, manganeso, óxido de etileno, cloruro de vinilo así como la radiactividad y los rayos X se han asociado también a factores desencadenantes de trastornos de fertilidad masculina. Además otros factores como la exposición a partículas de diesel que estimulan la activación de leucocitos y la exposición a ftalatos (presentes en los materiales plásticos) se ha asociado a un incremento del daño al ADN espermático.

El ejercicio físico aumenta la producción de desechos oxidativos, que pueden dañar muchas funciones celulares. La principal teoría, relacionada con las disciplinas de resistencia, es *la posibilidad de alteración de los parámetros seminales o de los niveles hormonales como consecuencia de la producción de radicales oxidativos y la disminución de los niveles de antioxidantes*. Las investigaciones confirman que las disciplinas de resistencia extrema generan sin lugar a duda un incremento del estrés oxidativo, lo cual ha sido demostrado en corredores de larga distancia y en triatletas participantes en competiciones

de Ironman. Sorprendentemente, el ejercicio genera estrés oxidativo sólo cuando alcanza niveles exhaustivos. Por el contrario, la actividad moderada permite la activación de las enzimas antioxidantes (14).

Otra de las causas de infertilidad masculina está relacionada con el daño en el ADN espermático. Sobre la naturaleza de este daño se sabe que es un fenómeno multifactorial y no del todo delimitado, no obstante se conocen algunos factores que pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto masculino como son:

- Empaquetamiento anormal de la cromatina.
- Deficiencias en la recombinación.
- Apoptosis tras la salida de los espermatozoides a los túbulos.
- Generación de ERO.

4.2. ESTERILIDAD IDIOPÁTICA

En el 40-75 % de los casos de infertilidad masculina no se identifica ningún factor asociado, se habla entonces de infertilidad masculina idiopática.

Estos varones consultan sin antecedentes de problemas de fertilidad y tienen unos resultados normales en la exploración física y las pruebas analíticas endocrinológicas. El espermiograma, sin embargo, revela una disminución del número de espermatozoides (oligozoospermia), una reducción de la motilidad de los espermatozoides (astenozoospermia) y muchas formas anormales de espermatozoides (teratozoospermia). Estas anomalías suelen aparecer juntas y se denominan síndrome de oligoastenoteratospermia (OAT) (12).

La OMS en una investigación estandarizada sobre la pareja infértil encontró que en el 51,5% de los hombres estudiados tenían alteración del espermiograma, de estos el 12,2% presentaba varicoceles como único factor demostrable y el 26,4% se le asignó causa idiopática. En hombres con normozoospermia, los casos de infertilidad idiopática muestran altos valores de generación de ERO y bajos valores de antioxidantes cuando se comparan con

hombres controles, en estos casos las razones de dichos incrementos no son conocidas.

La infertilidad masculina idiopática quizá pueda explicarse por varios factores, entre ellos, trastornos endocrinos como consecuencia de la contaminación ambiental, radicales reactivos del oxígeno o anomalías genéticas.

En la infertilidad masculina idiopática se ha empleado una amplia gama de tratamientos farmacológicos empíricos. Sin embargo, apenas existen datos científicos en respaldo de una estrategia empírica. Andrógenos, hCG/gonadotropina menopausica humana, bromocriptina, alfa- bloqueantes, corticosteroides sistémicos y suplementos de magnesio no resultan eficaces en el tratamiento del síndrome OAT. La FSH y los antiestrogenos en combinación con testosterona podrían ser beneficiosos en determinados pacientes. No obstante, se precisa una evaluación más detallada de estos medicamentos en estudios multicéntricos.

4.3. DIAGNÓSTICO

La evaluación de la función reproductiva debe incluir una completa historia médica, una exploración física y al menos dos seminogramas realizados con un intervalo de 2 a 4 semanas. Si el primer seminograma es normal, se puede obviar el segundo análisis.

En la anamnesis del varón deberíamos identificar la existencia de embarazos previos como factor de buen pronóstico y los antecedentes de cirugía testicular por criptorquidia, cirugía inguinal por hernias, así como otros procedimientos quirúrgicos pélvicos, quimioterapia, exposición a radiaciones, tóxicos (herbicidas, pesticidas, drogas y alcohol), procesos inflamatorios (epididimitis y orquitis), traumatismos testiculares, atrofia y estados obstructivos de las vías seminales como factores de mal pronóstico.

A continuación, se realiza el examen físico que, aunque se evalúa todo el cuerpo, está dirigido a la zona genital y a los caracteres sexuales secundarios (fenotipo, vello axilar y púbico, barba, voz), sin olvidar descartar ginecomastia y anosmia. La exploración andrológica se enfoca sobre el pene (buscando fimosis, hipospadias, cicatrices, placas de induración), testículos y epidídimo (posición, tamaño, consistencia y sensibilidad). El volumen testicular se aprecia mejor con el orquidómetro de Prader o el de Seager, considerándose un volumen de 20 a 24 cc como normal, mientras un volumen menor a 10 cc traduce una importante disminución del tejido espermatogénico y se correlaciona con valores elevados de FSH y bajos de inhibina. El tacto rectal se realiza sólo en aquellos casos que se considera conveniente evaluar características de la próstata. Para evaluar la presencia del varicocele, el paciente debe estar de pie y se le pedirá hacer maniobras de Valsalva mientras se le realizan las exploraciones semiológicas de inspección y palpación.

La evaluación inicial de la esterilidad masculina es sencilla y por ello la realización de un seminograma debería preceder a cualquier valoración invasiva de la mujer. Los valores de referencia del seminograma corresponden a población fértil pero en ningún momento son valores de normalidad, ni indican fertilidad o esterilidad, pues varones por debajo de esos valores pueden conseguir gestaciones. La solicitud de un seminograma debe realizarse en la primera visita.

4.4. IMPORTANCIA DEL SEMINOGRAMA

Es la prueba fundamental en el diagnóstico y tratamiento de la fertilidad masculina. El análisis de semen nos indica el estado funcional de la secreción exocrina de las glándulas sexuales masculinas y nos orienta sobre patologías del sistema genital. Debe realizarse utilizando técnicas y criterios estandarizados como los descritos por la OMS en 2010 (15).

Se deberá tener presente a la hora de interpretar los resultados obtenidos: el tiempo de abstinencia (idealmente 3-5 días), la obtención de todo el eyaculado,

Introducción

el método de recogida (debe ser por masturbación directamente en un frasco adecuado) y las condiciones y demora en el transporte del semen hasta el laboratorio.

Para la realización del análisis de semen será fundamental la realización de control de calidad internos y externos que aseguren la estabilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

Los parámetros básicos a determinar en un análisis de semen deben ser: examen macroscópico (licuefacción, aspecto, volumen, viscosidad y pH), concentración de espermatozoides y otras células, movilidad, vitalidad, morfología espermática y presencia de aglutinaciones.

Evaluación inicial macroscópica

A) Licuefacción. La licuefacción se realiza mediante una simple observación visual. Una muestra normal es una muestra licuada, homogénea, sin grumos ni coágulos.

B) Viscosidad.

C) Apariencia. Un semen normal debería ser homogéneo, gris opalescente.

- Aspecto traslúcido. Debido a que posiblemente tenga una baja concentración de espermatozoides.
- Aspecto marrón-pardo. Indicará un sangrado en tracto genital horas o días antes.
- Aspecto rojizo. Indicará la presencia de hematíes frescos, procedentes de un sangrado en el momento de la recogida.
- Aspecto amarillento. Indicativo de ictericia, o presencia de ciertas vitaminas. También es posible que se deba a presencia de altos niveles de flavoproteínas oxidadas, procedentes de vesículas seminales. Esto indica una elevada abstinencia. También en casos de leucospermia.

D) Volumen.

Se establece el límite inferior de referencia en 1,5 ml. Un volumen bajo es indicativo de algunas de las siguientes alteraciones:

- Obstrucciones de vías seminales o ausencia de conductos deferentes.
- Pérdida de alguna fracción de la muestra en el momento de la recogida.
- Eyaculación retrógrada, patología que ocasiona que el semen no sigue su vía natural de salida, que es la uretra, sino la vía ascendente y a través del orificio uretro vesical se vierta dentro de la vejiga junto con la orina.

Un volumen alto puede ser producido por el aumento de volumen de secreción de algunas glándulas, en caso de inflamación.

E) pH.

El pH refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata. El límite inferior de referencia establecido es de 7,2. Un pH por debajo de 7, unido a oligo o azoospermia y a un volumen bajo, nos va a sugerir la agenesia u obstrucción de vesículas seminales y/o conductos deferentes, así como puede indicar infección. Esto impide la salida total o parcial de secreciones procedentes del testículo (espermatozoides) y de vesículas seminales, con un pH básico.

F) Células no espermáticas.

El eyaculado contiene otras células y su identificación puede ser clínicamente relevante. Son las llamadas células no espermáticas, que incluyen a células epiteliales y células redondas ($\leq 5 \times 10^6$ células/ml). El nombre genérico de células redondas engloba a células germinales inmaduras (1-3% con respecto a 100 espermatozoides) y a leucocitos ($\leq 1 \times 10^6$ leucocitos/ml).

Evaluación inicial microscópica:

A) Movilidad.

Introducción

La clasificación de los tipos de movilidad que introduce el quinto manual de la OMS, ha supuesto un gran cambio con relación a manuales anteriores. En estos se diferenciaba la movilidad progresiva en lenta y rápida. En este nuevo manual se unifican en un solo tipo de movilidad, la movilidad progresiva, quedando por tanto sólo tres tipos de movilidad:

- Espermatozoides inmóviles.
- Espermatozoides con movilidad no progresiva. Incluye todos los patrones de movilidad pero con ausencia de progresión como el avance en pequeños círculos.
- Espermatozoides con movilidad progresiva: lineal o en círculos amplios, independientemente de la velocidad.

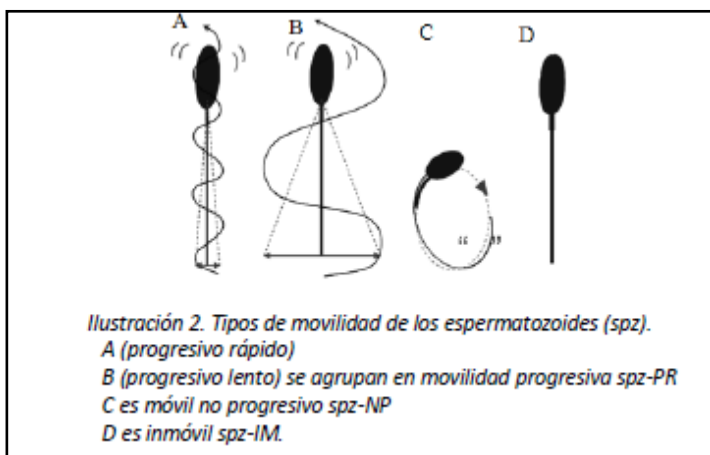


Figura 4. Tipos de movilidad de los espermatozoides.

También ha habido cambios en los valores de referencia. El quinto manual establece el límite inferior de referencia para la movilidad total en 40%, y para la movilidad progresiva 32%.

B) Recuento.

El límite inferior normal es de $\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides/mL o $\geq 39 \times 10^6$ espermatozoides por eyaculado.

C) Morfología.

La opinión casi unánime de los líderes de opinión abraza definitivamente los criterios de Tygerberg, que se basan en la asunción de que los espermatozoides que alcanzan el canal endocervical, o que se unen a la zona pelúcida de los ovocitos son potencialmente fecundantes, y su aspecto morfológico y dimensiones pueden aplicarse para definir el concepto de morfología normal (Menkveld, 2010). Únicamente se consideran normales los espermatozoides que no tienen ningún defecto morfológico:

- Cabeza perfectamente oval y contorno regular (4-5 μm de largo y 2,5-3,5 μm de ancho) y una relación largo: ancho entre 1,5 y 1,75.
- La región acrosómica debe ocupar el 40-70% de la zona anterior de la cabeza.
- Cola única, de 45 μm de longitud no enrollada, rota ni doblada, con inserción centrada en la cabeza siguiendo el eje.
- Pieza intermedia de 1 μm ancho y 7-8 μm largo.
- Gotas citoplasmáticas no superiores a un tercio del tamaño de la cabeza.
- Ausencia de vacuolas en la cabeza.

Los defectos espermáticos se clasifican según la ubicación topográfica (cabeza, cuello y pieza intermedia, cola, gotas citoplasmáticas). Puesto que un mismo espermatozoide puede tener más de un defecto, se incluye el índice de teratozoospermia, definido como el número medio de anomalías por espermatozoide anormal.

La aplicación de los criterios de Tygerberg entraña una notable dificultad técnica, porque es difícil precisar un nivel de corte consistente entre distintos observadores. Los reducidos valores absolutos de normalidad con los que se trabaja magnifican el problema del error analítico y obligan a rigurosos controles de calidad. Por otra parte, algunos de los fenotipos más graves de teratozoospermia siguen sin quedar reflejados en el dictamen citomorfológico. Parece necesario dar nuevos pasos para crear algún sistema de estandarización que permita en el futuro calibrarla interpretación de la morfología entre distintos laboratorios.

Introducción

La clasificación de normalidad de la OMS se basa en considerar un espermatozoide normal al integrante de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical. Se considera normal tener >4% de formas normales de espermatozoides.

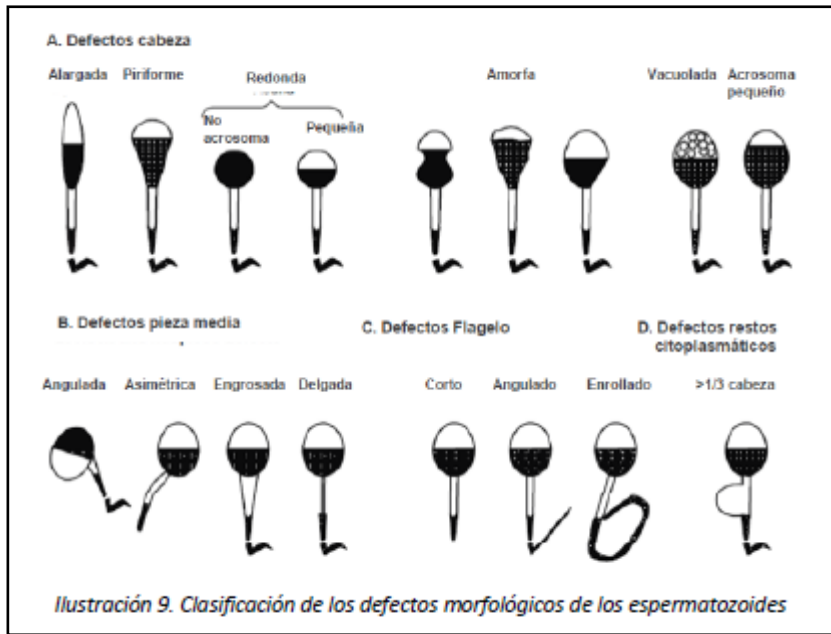


Figura 5. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides.

D) Vitalidad.

Se considera normal un valor $\geq 58\%$ de espermatozoides vivos. El manual de la OMS sugiere que el test de vitalidad debe hacerse de forma rutinaria en todas las muestras y considera que es obligatorio cuando la movilidad progresiva es menor del 40%.

Esterilidad de causa masculina

Edición	2. ^a	3. ^a	4. ^a	5. ^a
Año	1987	1992	1999	2010
Volumen (ml)	2	2	2	1,5
Concentración espermática (x 10 ⁶ /ml)	20	20	20	15
Espermatozoides/eyaculado (x 10 ⁶)	40	40	40	39
Movilidad progresiva (%)	50	50	50	32
Vitalidad (%)	50	75	75	58
Morfología normal (%)	50	30	(15)	4
pH	7,2-7,8	7,2-8,0	≥ 7,2	≥ 7,2
Leucocitos (x 10 ⁶ /ml)	< 1	< 1	< 1	< 1
Anticuerpos (MAR, %)	< 10	< 10	< 50	< 50
Anticuerpos (IBT, %)	< 10	< 20	< 50	< 50
Zinc en plasma seminal (μmol/eyaculado)	≥ 2,4	≥ 2,4	≥ 2,4	> 2,4
Fructosa (μmol/eyaculado)	≥ 13	≥ 13	≥ 13	≥ 13
Glucosidasa neutra (mU/eyaculado)	—	≥ 20	≥ 20	≥ 20

Figura 6. Evolución de los valores de referencia del seminograma en las distintas ediciones de los manuales de la OMS.

Nomenclatura de trastornos seminales:

- *Normozoospermia*: Eyaculado normal definido por los valores de referencia.
- *Oligozoospermia*: Se define como el recuento de espermatozoides inferior a 15 x10⁶ /mL. Esta puede ser:
 - Ligera: 10 -<15 x 10⁶/mL.
 - Moderada: 5 -< 10 x 10⁶/mL.
 - Severa: <5 x 10⁶/mL.
- *Astenozoospermia*: Movilidad espermática <32% de espermatozoides móviles progresivos.
- *Teratozoospermia*: <4% de formas normales espermáticas.
- *Oligoastenoteratozoospermia*: Combinación de las tres alteraciones seminales anteriores.
- *Azoospermia*: Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- *Aspermia*: Ausencia de eyaculado.
- *Criptoospermia*: No hay espermatozoides en el eyaculado pero sí son observados tras centrifugación.

- *Hemospermia*: Presencia de hematíes en el eyaculado.
- *Leucospermia*: Presencia de leucocitos en el eyaculado por encima de los valores de referencia.
- *Necrozoospermia*: Presencia de menos de un 58% de espermatozoides vivos.

4.5. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Durante la maduración en el epidídimo los espermatozoides incorporan diferentes glicoproteínas y péptidos que inhiben la capacitación (actuarían como factores descapacitantes). Este estado de descapacitación se mantiene tras la eyaculación debido a estas incorporaciones y a la presencia de otros factores decapacitantes en el plasma seminal. Además, el plasma seminal puede contener agentes infecciosos que deben eliminarse antes de cualquier técnica de reproducción asistida, ya que son susceptibles de provocar infecciones en la mujer y contaminar los cultivos de ovocitos y embriones. Exposiciones prolongadas (más de 2 horas) de los espermatozoides al plasma seminal pueden provocar una pérdida de la capacidad fecundante y ejercer un efecto negativo sobre su movilidad. Así la separación de los espermatozoides del plasma seminal debe realizarse lo más rápido y eficazmente posible.

Por lo tanto los objetivos de las técnicas de preparación y mejora de semen serán:

- Separar los espermatozoides del plasma seminal que contiene sustancias decapacitantes, prostaglandinas y linfoquinas.
- Retirar los espermatozoides muertos, leucocitos, células redondas y agentes infecciosos.
- Aportar un medio de cultivo que contenga moléculas captadoras de esteroides (albúmina) y una composición iónica que apoye la homeostasis del espermatozoide y facilite las señales de transducción (calcio, bicarbonato).

La finalidad de este proceso es seleccionar los espermatozoides móviles y mejorar la calidad de los mismos (porque disminuye la liberación de linfoquinas

y reduce la formación de radicales libres), y será un requisito previo para cualquier técnica de reproducción asistida. *El adecuado procesamiento de la muestra va a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide, tanto in vivo como in vitro y será fundamental para el éxito de la reproducción asistida.*

Se ha propuesto el *test de recuperación de espermatozoides móviles (REM)* en el estudio de la pareja estéril como prueba para distinguir qué parejas se beneficiarán de la inseminación artificial y cuáles no, porque incluye la concentración, la movilidad así como los efectos del procesamiento de los espermatozoides. Los niveles umbral en los distintos trabajos oscilan desde 0,8 a 5 millones. No se ha podido identificar un umbral óptimo de REM que permita aconsejar a las parejas. Se requieren estudios adicionales para evaluar la capacidad predictiva del REM en los estudios de fertilidad. Algunos autores proponen que cada centro establezca su punto de corte en función de datos clínicos y de laboratorio de cada centro.

De las técnicas de capacitación anteriormente descritas las más utilizadas en los laboratorios por su simplicidad y eficacia son el *swim-up* y los gradientes de densidad.

- *Swim-up:*

El semen licuado se deposita sobre un medio de cultivo y los espermatozoides con buena movilidad se dirigen al medio de cultivo de forma semejante al proceso *in vivo* a través del moco cervical.

- *Gradientes de densidad:*

Su fundamento se halla en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para plasma seminal, células redondas, detritus y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva. Los gradientes de densidad disgregan las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes se separan hasta alcanzar una

Introducción

posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra), donde ya no se desplaza más.

- Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad (el fondo del tubo).
- El plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las células.
- Los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes.

Es menos fisiológico que el método de *swim-up* y se utiliza fundamentalmente para sémenes con parámetros bajos y sémenes criopreservados.

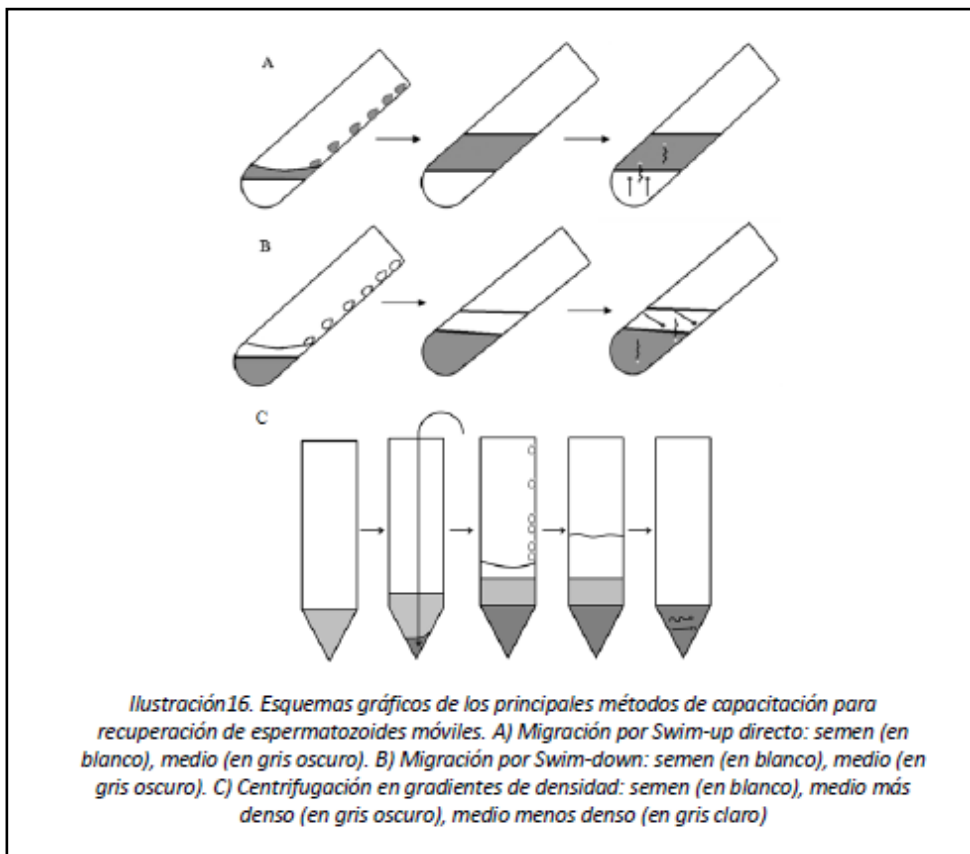


Figura 7. Esquemas gráficos de los principales métodos de capacitación para recuperación de espermatozoides móviles.

Múltiples trabajos coinciden en que en cuanto a resultados clínicos (tasa de embarazo y tasa de recién nacidos vivos), no hay evidencia científica suficiente para recomendar una técnica de preparación de semen, al considerar

resultados de los ensayos cuasi aleatorios, la técnica de gradientes de densidad puede parecer mejor, pero necesita confirmarse con ensayos clínicos aleatorios.

Respecto a los parámetros seminales tras la preparación de semen, la técnica de gradientes parece mejor en cuanto a concentración de espermatozoides y a tasa de recuperación de espermatozoides móviles, mientras que la técnica de *swim up* recupera los espermatozoides con mejor movilidad, y en cuanto a la morfología no se encontraron preferencias. En términos generales la técnica de gradientes puede parecer superior, aunque debe confirmarse con ensayos clínicos de calidad.

4.6. EVALUACIÓN ALTERACIONES SEMINALES

Evaluación de la oligo-asteno-teratozoospermia (13)

- La *oligozoospermia* suele asociarse a otras alteraciones de la calidad seminal; es decir, astenozoospermia y teratozoospermia. Las formas más graves (<5 millones de espermatozoides por mL), se estudian valorando la FSH y el cariotipo. La mayoría son de origen idiopático, aunque en muchos casos se puede asociar a varicocele, infecciones, anticuerpos antiespermatozoides y factores endocrinos, entre otros.

- La *astenozoospermia* pura se asocia a defectos genéticos de la estructura del flagelo, como el síndrome de Kartagener. No obstante, la deficiencia motriz del espermatozoide puede proceder desde su origen testicular, en su paso por el epidídimo, o al confluir con otros elementos del plasma seminal. *Hace 60 años el Prof. Botella ya publicó que, la medición de la movilidad progresiva lineal del espermatozoide humano era un indicador in vitro de la calidad y función espermática (90).*

En general, la oligoastenozoospermia es la entidad observada con más frecuencia.

Introducción

- La *teratozoospermia* es también un parámetro constante en los hallazgos en el seminograma, aunque es poco probable observarlo en forma pura. Entre las causas más comunes están el varicocele, las alteraciones citogenéticas y las gonadotoxinas. En general, la mayoría de las alteraciones observadas en los seminogramas involucran a los tres parámetros en forma asociada.

Evaluación de la azoospermia (13)

Es importante destacar que el diagnóstico de azoospermia se basará en por lo menos dos espermigramas de calidad y, además, debe ser realizado posterior a la centrifugación del semen. A continuación, es importante investigar la posible causa de la azoospermia, básicamente, diferenciar entre si es obstructiva o secretora.

En general, la orientación hacia la azoospermia de causa obstructiva vendrá dada por los antecedentes personales a episodios de epididimitis, prostatitis o cirugía inguinoescrotal. En caso de asociarse con ausencia congénita de los conductos deferentes, posiblemente involucra a una causa genética adicional.

Por contraste, la azoospermia secretora o no obstructiva es consecuencia de una estimulación hormonal inadecuada y se sospecha por los antecedentes de criptorquidea, orquitis, traumatismos, radio o quimioterapia. Las situaciones de azoospermia secretora son por causas pretesticulares o consecuencia de arrestos de la espermatogénesis, síndrome de sólo células Sertoli, hialinización testicular o hipoespermatogénesis severa.

CAPÍTULO 5. ANATOMIA APARATO GENITAL MASCULINO

El aparato reproductor masculino está formado por varios órganos que según su función se podrían clasificar en cuatro grupos:

- *Dos testículos.* Tienen una doble función, por una parte producen los espermatozoides mediante un proceso llamado espermatogénesis y por otra ejercen una importante regulación endocrina, tanto a nivel reproductor como sobre otros órganos y funciones de nuestro cuerpo.
- Las *vías seminales*, que también son dobles hasta su conexión con la próstata: transportan los espermatozoides a lo largo del sistema reproductor.
- Las *glándulas accesorias* aportan una serie de sustancias vitales para la función reproductora porque forman el líquido seminal, y además tienen una función nutritiva o reguladora.
- El *pene* deposita el semen en la vagina.

A) Testículos

Los testículos se hallan en la región perineal, tras la base del pene, en el interior de la bolsa escrotal. El escroto no tiene grasa y sus músculos reaccionan al calor extendiendo o contrayendo la piel. Las dos gónadas (testículos) no ocupan el mismo nivel, ya que en la mayoría de los hombres el testículo izquierdo baja un poco más que el derecho.

Están suspendidos de su extremo inferior por el cordón espermático y están desprovistos de adherencias en la mayor parte de su superficie exterior, por lo que resultan móviles en todos los sentidos, pudiendo contraerse y ascender hacia el anillo inguinal.

El escroto y el hecho de que están alojados fuera del abdomen, hacen que se mantenga la temperatura unos dos grados centígrados por debajo de la

temperatura corporal. Esto será de vital importancia para el mantenimiento de la espermatogénesis.

El testículo y el epidídimo están envueltos por la túnica albugínea, que es una capa fibrosa de tejido conjuntivo blanco, denso y elástico.

Los conductos o túbulos seminíferos son los conductos productores de los espermatozoides. Se encuentran dentro de los lobulillos testiculares (hay entre 200 y 300 por testículo) formados por los septos testiculares, que parten desde la túnica albugínea y se unen en el mediastinum testis. Cada lobulillo contiene de 1 a 4 túbulos seminíferos productores de espermatozoides. Los túbulos seminíferos desembocan a través de los túbulos rectos en las cavidades denominadas rete testis en el mediastinum testis.

En cuanto a la vascularización, los testículos están irrigados por las arterias espermáticas (la arteria deferencial y la arteria funicular). Del drenaje sanguíneo están encargadas las venas espermáticas y cuando se obstruyen producen el varicocele.

A partir de la pubertad, los túbulos seminíferos, desarrollan una pared gruesa y compleja llamada epitelio germinal, compuesta por dos tipos de células:

- Las células germinales, que proliferan y se diferencian en espermatozoides.
- Las células de Sertoli, que sostienen a las células germinales e intervienen en su nutrición.

Una lámina basal separa el epitelio seminífero del intersticio gonadal. El intersticio gonadal está formado por tejido conjuntivo, tejido linfático, por capilares sanguíneos y por células de Leydig productoras de testosterona.

Las *células de Sertoli* se caracterizan por:

- Se extienden radialmente hacia la luz tubular y su citoplasma emite prolongaciones que rodean las células germinales.

Introducción

- Forman la barrera hematotesticular.
- Protegen las células germinales y las nutren.
- Proporcionan apoyo mecánico para las células germinales.
- Eliminan células espermáticas degeneradas.
- Sintetizan proteínas relacionadas con la función reproductora.

Las *células germinales* tienen distinto grado de diferenciación dependiendo de la zona del epitelio germinal en donde se localicen:

- En la zona basal, están las espermatogonias y los espermatocitos primarios.
- En la zona adluminal se diferencian hacia espermatocitos secundarios y espermátides.

La *barrera hematotesticular*:

- Está formada por las células de Sertoli a través de complejos de unión.
- Actúa de barrera entre la luz del tubo y el espacio intersticial. Esta barrera es dinámica, permite la migración de espermatocitos de la zona basal a la adluminal, y es infranqueable por células perteneciente al sistema inmunitario como son los linfocitos.
- Las espermatogonias y espermatocitos primarios se encuentran en la zona basal, por fuera de la barrera.
- Los espermatocitos secundarios y espermátides se encuentran en el compartimento adluminal, dentro de la barrera.
- La barrera aísla el espermatozoide, para que no sea reconocido como propio por el sistema inmune.

La *termorregulación* se consigue mediante los siguientes mecanismos:

- La presencia de receptores de la temperatura en la piel del escroto activan grandes glándulas sudoríparas adrenérgicas.

- Hay una actuación muscular que regula la cercanía de los testículos al cuerpo.
- Por último hay una regulación sanguínea, de forma que la sangre arterial que entra en los testículos se enfría por la sangre venosa que sale de ellos.

B) Vías seminales

Las vías seminales están constituidas por: tubos rectos, rete testis, conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes, ampolla deferencial y el conducto eyaculador. Los extremos terminales de los túbulos seminíferos, revestidos sólo por células de Sertoli, se estrechan y forman los *tubos rectos*, los cuales unen el túbulo seminífero con la rete testis.

La *rete testis* es una red de delicados túbulos, situado en el hilio del testículo, mediastino testicular, que lleva los espermatozoides desde los túbulos seminíferos a los vasos eferentes. En la rete testis el líquido seminal se reabsorbe, concentrando los espermatozoides.

Los *conductos eferentes* unen la rete testis con la cabeza del epidídimo. La luz de los tubos se reviste de dos tipos celulares:

- Células ciliadas, altas: arrastran el contenido celular en dirección al epidídimo.
- Células no ciliadas, bajas: realizan procesos de endocitosis.

El *epidídimo* es un conducto altamente contorneado, entre el testículo y vaso deferente. Tiene forma de media luna, y se divide en cabeza, cuerpo y cola. Está tapizado por:

- Un epitelio pseudoestratificado que produce la absorción de casi el 90% de líquido testicular.
- Por la musculatura lisa que produce movimientos peristálticos para transportar los espermatozoides.

Aparte de las funciones de transporte y servir de vía eferente, el epidídimo:

- Produce la maduración de los espermatozoides y la concentración de estos al reabsorber líquido. Esta absorción se produce a nivel de la cabeza del epidídimo.
- Aumenta la movilidad de los espermatozoides a través de la proteína de avance de movilidad.
- Actúa almacenando los espermatozoides (unos 42 días).
- Destruye los espermatozoides tras larga abstinencia sexual. Por ejemplo en vasectomías.

La vía seminal continúa con los *conductos deferentes*. Estos últimos transportarán el semen durante el coito desde la cola del epidídimo hasta la ampolla deferencial. La ampolla deferencial es una dilatación del conducto deferente, que almacena espermatozoides durante el coito. Está situada antes del conducto eyaculador. El *conducto eyaculador*:

- Perfora la próstata a nivel del veru montanum.
- La última porción desemboca en la uretra.
- La normalidad es fundamental para una buena eyaculación.

C) Glándulas accesorias

Las glándulas accesorias se refieren a: las vesículas seminales, la próstata, las glándulas bulbouretrales de Cowper y las glándulas uretrales de Littré.

Vierten a las vías seminales el 80% del volumen del eyaculado. Contribuyen de esta forma muy decisivamente a la formación del plasma seminal, cuya función es ser: medio nutritivo, vehículo de transporte y protección del tracto urinario.

Las *vesículas seminales* están situadas en la base de la próstata y unidas a ella por su extremo inferior. Cada una está asociada al deferente y al conducto eyaculador. El eyaculado que segregan se caracteriza por:

- Constituye entre el 50-70% del líquido seminal de un eyaculado.
- Forma parte de la segunda porción del eyaculado.
- Es un líquido mucoide, viscoso y amarillento, de pH alcalino.
- Es rico en fructosa y otras sustancias nutritivas. Contiene otras sustancias como prostanglandinas y fibrinógeno.

La *próstata* está situada en la base de la vejiga, rodeando la primera porción de la uretra. Su parénquima glandular constituye una glándula tubuloalveolar. El líquido prostático nutre y protege al espermatozoide y se caracteriza por:

- Constituye entre un 15 y un 30% del volumen final de éste.
- Forma parte de la primera porción del eyaculado.
- Es un líquido opalescente, de pH 6.5.
- Es rico en ácido cítrico, fosfatasas ácidas, zinc, manganeso y calcio.

Las *glándulas bulbouretrales* o *glándulas de Cowper* son glándulas del tamaño de un guisante y situadas a ambos lados del bulbo uretral. Vierten de manera gradual a la uretra, ante la estimulación erótica, actuando como lubricante de ésta ante el paso del semen a gran velocidad. El líquido seminal que segregan es un líquido claro, viscoso y mucoide, rico en galactosaminas, galactosa, ácido oxálico y mucoproteínas.

Las *glándulas uretrales de Littre* están situadas a lo largo de la uretra, vierten un fluido viscoso, que actúa limpiando y lubricando la uretra, favoreciendo el paso de los espermatozoides.

D) Pene

El pene está formado por tres grandes cilindros de tejido eréctil, rodeados por una vaina elástica. Cada cilindro se rellena de sangre durante la excitación sexual. Los dos cilindros superiores, llamados cuerpos cavernosos, son los responsables de la rigidez e incremento de volumen y longitud durante la

Introducción

erección. El cilindro inferior, llamado cuerpo esponjoso, acaba en el glande. La uretra atraviesa el cuerpo esponjoso. Durante la erección se mantiene más blando que los cuerpos cavernosos.

CAPÍTULO 6. EL ESPERMATOZOIDE

6.1. ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide se componen principalmente de dos partes: una cabeza y su flagelo.

1) *Cabeza: acrosoma, membrana y núcleo*

La *cabeza* contiene dos partes principales: el *acrosoma*, que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza, y el *núcleo*, que contiene la carga genética del espermatozoide (23 cromosomas, en el pronúcleo). En los seres humanos la medida de la cabeza del espermatozoide es de 5 μm de longitud. Tanto el pronúcleo como el acrosoma están envueltos en medio de una pequeña cantidad de citoplasma y revestidos por una membrana plasmática que une la cabeza al cuerpo del espermatozoide.

El *acrosoma* es una capa formada por las enzimas hialuronidasa, acrosina y neuraminidasa que favorecerán la rotura de la zona pelúcida para la penetración, la cual rodea al ovocito. El acrosoma, una organela derivada del aparatode Golgi de las espermatídes, consiste en un saco aplanado con un contenido denso de enzimas hidrolíticas que cubren las dos terceras partes de la región anterior de la cabeza del espermatozoide.

El *núcleo*, después de que el acrosoma abra la zona pelúcida del ovocito, es la única parte que entra a su citoplasma, dejando atrás la membrana ya vacía, para luego fusionarse con el núcleo del óvulo, completarse como célula diploide y empezar la división celular (mitosis).

2) *Flagelo: cuello, pieza media, cola, pieza terminal*

El *cuello* es muy corto, por lo que no es visible mediante el microscopio óptico. Es ligeramente más grueso que las demás partes del flagelo y contiene residuos citoplasmáticos de la espermatída. Tras estos elementos contiene un

El espermatozoide

centríolo, el distal, que origina la pieza media, y el otro, el proximal, desaparece luego de haber dado origen al flagelo. Contiene una placa basal de material denso que lo separa de la cabeza y es donde se anclan 9 columnas protéicas, que son centriolos modificados, continuándose por toda la cola. De uno de ellos (el distal) se origina la pieza media.

La *pieza media* (de unos 4 o 5 μm de longitud) posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal, que proveen de energía al espermatozoide, produciendo ATP.

La *cola* (de 35 μm) le proporciona movilidad (zona flagélica funcional recubierta sólo de membrana).

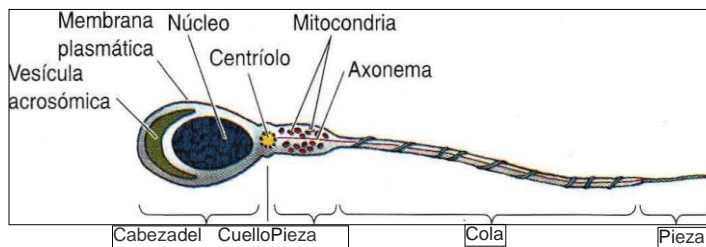


Figura 8. Estructura del espermatozoide

La Membrana plasmática del espermatozoide

Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide. La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y cola.

Estructuralmente se compone de tres capas o zonas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos-agua y glycocalix.

- La *bicapa lipídica* esta subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos orientadas internamente unas a

otras. La mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos y colesterol, en una razón de 0.64:0.36. La cantidad de colesterol, relativo al fosfolípido, determina la fluidez de la membrana. En general mientras más alta sea la concentración relativa de los fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. La concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma.

- Las *proteínas* se encuentran también entre los lípidos y hacen hasta un 50% del peso de la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como proteínas estructurales (integrales) y como puntos de unión para otras proteínas periféricas. Las estructurales pueden también actuar como canales o poros a través de los cuales pequeñas moléculas pueden pasar al citoplasma de los espermatozoides. El resto de las proteínas estructurales son encontradas entre las dos capas de la membrana. Las proteínas de unión actúan como receptores de superficie para otras proteínas periféricas desde el medio que las rodea, por medio de sus cadenas laterales de carbono cargadas negativamente. Las proteínas que se unen a, o son parte de la membrana, son conocidas por participar en las interacciones ovulo-espermatozoide.
- La *Interfase agua-fosfolípido*, que es la unión entre los grupos de cabezas polares hidrofílicas de la capa lipídica y el medio circundante (principalmente agua) y en el cual se encuentra el glycocalix. El glycocalix es una capa externa de polisacáridos. Su función exacta no es clara, pero se piensa que está involucrado en antigenicidad, adherencia celular y permeabilidad específica. Es sabido que dentro del glycocalix existen uniones para proteínas periféricas. Estas proteínas son provenientes del plasma seminal y actúan estabilizando al espermatozoide durante su paso por el tracto masculino y femenino. También pueden estar involucradas en la capacitación.

6.2. LA ESPERMATOGÉNESIS

Se trata de un proceso complejo de maduración y diferenciación celular, mediante el cual las células germinales indiferenciadas se transforman en espermatozoides (16). Se produce en el testículo, a nivel de los túbulos seminíferos. En el testículo también ocurre la producción de hormonas sexuales (esteroidogénesis), que se produce a nivel de tejido intersticial. Ambos procesos están interrelacionados, con el objetivo de conseguir la correcta producción de espermatozoides. La espermatogénesis se inicia con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros. En esta progresión se diferencian tres fases:

a) Fase proliferativa

En *la fase proliferativa* se produce la continua repoblación de espermatogonias. Las espermatogonias son células diploides situadas en la base del tejido germinal. En el hombre se han descrito tres tipos:

- Espermatogonias del tipo A oscuras.
 - Espermatogonias del tipo A pálidas o claras.
 - Espermatogonias del tipo B.
-
- Las *espermatogonias oscuras* son células diploides. Se denominan así por tener la cromatina nuclear fina y oscura. Se consideran las células madre de la espermatogénesis. Son células diploides quiescentes que sólo entran en mitosis cuando se reduce drásticamente la población de espermatogonias. La división produce más espermatogonias oscuras y algunas claras.
 - Las *espermatogonias claras* son igualmente diploides. La cromatina nuclear es fina y pálida. Se dividen a intervalos regulares y dan lugar a más espermatogonias pálidas o espermatogonias del tipo B. Las primeras se unen por el citoplasma pudiendo derivar a tipo B por maduración.
 - Las *espermatogonias del tipo B* siguen siendo células diploides, la cromatina nuclear es granulosa y oscura y se dividen produciendo más espermatogonias.

b) Fase de maduración

En la fase de maduración se produce el fenómeno de la *meiosis*. Es un proceso de división celular en el cual una célula diploide ($2n$) experimenta dos divisiones nucleares y citoplasmáticas sucesivas. La primera conocida como meiosis I y la segunda como meiosis II, generando al final cuatro células haploides. Previo a la meiosis ocurre un proceso preparatorio similar a la mitosis. Tanto la meiosis I como la II están a su vez divididas en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase.

- Durante el proceso preparatorio se produce el paso de espermatogonia a espermatocito primario. Como consecuencia se produce un aumento de tamaño de la célula debido a la fabricación acelerada de orgánulos, proteínas y otras materias celulares. Pero lo más importante es que el material genético se replica. Como consecuencia, los cromosomas, que hasta el momento tenían una sola cromátida, eran $2n$ de dotación genética, ahora tiene dos, lo que podríamos llamar $2n \times 2$.
- Tras el proceso preparatorio se produce la primera meiosis, *Meiosis I*, también llamada reduccional. Como consecuencia un espermatocito primario da lugar a dos espermatocitos secundarios. Con la Meiosis I pasamos de una célula con dotación genética $2n \times 2$, o sea con 46 cromosomas con dos cromátidas por cromosoma a una con dotación $n \times 2$, células haploides en cuanto al n° de cromosomas, pero su contenido de DNA es diploide ya que tienen dos cromátidas ($n \times 2$). La Meiosis I se divide en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. La profase se divide a su vez en cinco: leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis. Durante la profase se produce el fenómeno de apareamiento de cromosomas homólogos (sinapsis) y el intercambio de material genético entre ellos (crossing over). Este fenómeno es muy importante al aumentar la diversidad genética.
- Tras la Meiosis I o Meiosis reduccional se continúa con la *Meiosis II* o Meiosis ecuacional. Como resultado final, un espermatocito secundario da lugar a dos espermátides. La dotación genética pasa de $n \times 2$ del espermatocito a una dotación haploide (23 cromosomas) y además cada cromosoma tiene ya

El espermatozoide

solamente una cromátida. La meiosis II es un proceso similar a una mitosis, con cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase.

c) Fase de diferenciación

El proceso de transformación sin división celular es conocido como *espermioogénesis*, en la que las espermátides se transforman en espermatozoides. Durante la espermioogénesis se producen una serie de cambios: desarrollo del acrosoma, desarrollo del flagelo, reorganización del núcleo y reorganización del citoplasma.

- *Desarrollo del acrosoma.* El aparato de Golgi, del cual deriva el acrosoma, forma vesículas proacrosómicas que se unen y desplazan junto al núcleo hacia el extremo apical de la cabeza.
- El *desarrollo del flagelo* se inicia cuando los centriolos emigran hacia la periferia. Del centriolo distal se origina el axonema. Conforme se alarga, los centriolos se invaginan y las mitocondrias se disponen helicoidalmente alrededor del flagelo, formando la pieza intermedia.
- En cuanto a la *reorganización del núcleo*, este se vuelve elíptico, adopta posición excéntrica, se produce la condensación de la cromatina y la sustitución de histonas por protaminas.
- En la *reorganización del citoplasma*, éste es reducido en su mayor parte, bien porque es fagocitado por las células de Sertoli o bien porque es liberado en el interior de los túbulos. Puede permanecer unido al espermatozoide durante un tiempo.

La barrera hematotesticular está formada por las células de Sertoli, que se extienden desde la membrana basal hasta la luz de los túbulos seminíferos. Estas células conectan entre ellas mediante fuertes complejos de unión, formando un anillo sin solución de continuidad dentro de cada túbulo seminífero. Estos complejos de unión aparecen durante la pubertad, coincidiendo con el comienzo de la espermatogénesis. Durante la espermatogénesis las células germinales se van desplazando desde el

compartimento basal hasta el adluminal. Esto es posible gracias al carácter dinámico de la barrera, con aparición y desaparición de los complejos de unión. De esta manera se crea un ambiente único para el desarrollo de la meiosis y espermatogénesis. Por otra parte las células de Sertoli retienen parte del citoplasma de las espermatídes que salen a la luz tubular, formando los cuerpos residuales, que son fagocitados posteriormente.

En la *cinética de la espermatogénesis* hay que destacar varios aspectos peculiares.

- La espermatogénesis es un proceso que dura 72 días. Cuando se estudia una sección determinada de un túbulo, se encuentra que no contiene todos los tipos de células germinales, sino sólo algunos, que forman asociaciones.
- Hay 6 tipos de asociaciones diferentes, conocidas como estadíos. Los estadíos se van sucediendo. Una sección del túbulo irá pasando por los diferentes estadíos, del I al VI. Cada estadío dura 16 días, por lo que la duración total de la espermatogénesis será de 4,5 estadíos.
- En el tubo semenífero cada ciclo de la espermatogénesis se desarrolla siguiendo una distribución helicoidal. Empieza con las espermatogonias desde la membrana basal hasta acabar con los espermatozoides formados en el interior del tubo.

Además en una sección determinada no sólo encontramos un estadío, sino varios, que se superponen. Esto se debe a que en el testículo se desarrollan en el tiempo, tres ciclos a la vez.

6.3. FENÓMENOS ESPERMÁTICOS PARA CONSEGUIR CAPACIDAD FECUNDANTE

Para conseguir la fecundación, el espermatozoide debe abandonar el plasma seminal, atravesar el moco cervical, llegar al lugar de fertilización y penetrar las capas que circundan al ovocito, fusionándose con el mismo. En su ruta, el espermatozoide debe sufrir capacitación y reacción acrosómica, así como generar un segmento ecuatorial fusigénico (17).

1. Migración espermática.

La movilidad es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de una muestra de semen. Un espermatozoide inmóvil es incapaz de atravesar el moco cervical femenino y mucho menos las envolturas del ovocito. El proceso evolutivo en la adquisición de la movilidad de los espermatozoides, es el siguiente:

- Los espermatozoides en el testículo son inmóviles o con poca movilidad, debido probablemente a la inmadurez de la membrana plasmática.
- En la cabeza y porción proximal del cuerpo del epidídimo siguen siendo inmóviles o tienen movimientos vibratorios muy débiles. Algunos tienen un batido flagelar vigoroso, pero sin efecto progresivo.
- En la parte media del cuerpo del epidídimo predomina este movimiento flagelar vigoroso, pero son pocos los espermatozoides con movimiento progresivo.
- La madurez en el movimiento se alcanza en la parte distal del cuerpo del epidídimo, donde los espermatozoides adquieren la capacidad de progresar eficazmente.

El camino que debe recorrer el espermatozoide desde la eyaculación es largo, atravesando el canal cervical y ascendiendo hasta las trompas. Cuando llega al ovocito todavía debe atravesar las diferentes barreras celulares que lo rodean antes del contacto célula-célula. Esto se consigue gracias al flagelo, que dota al espermatozoide de movimiento. En el plasma seminal se mueve a una velocidad que fluctúa entre 10 y 60 micras/segundo. El flagelo produce un movimiento ondulatorio, batiendo aproximadamente 10 veces por segundo. Esta batida se propaga desde la base del flagelo en dirección a la cabeza, lo que lo conduce hacia delante. Esto será fundamental para poder atravesar las diferentes estructuras del ovocito.

La importancia de la proteína dineína se pone de manifiesto en personas que presentan el síndrome de Kartagener. Sus espermatozoides carecen de esta proteína y padecen una esterilidad por ausencia total de movimiento de los

espermatozoides. El movimiento del flagelo se produce cuando los brazos de dineína de un par de microtúbulos se deslizan sobre el par contiguo, pareciendo que caminasen. Esto produciría torsiones y angulaciones que al irse propagando por toda la longitud y al resto de tubos explicaría el movimiento ondulatorio. Es lo que se conoce como Hipótesis de deslizamiento de microtúbulos.

2. Capacitación.

Los espermatozoides de todos los mamíferos placentarios son incapaces de fecundar el ovocito directamente desde el eyaculado, y deben experimentar un proceso en el que se producen cambios moleculares denominados capacitación. Los espermatozoides adquieren la capacidad de fecundar el ovocito después de haber permanecido durante un tiempo en el tracto genital femenino. Una definición más exacta sería aquella que describe la capacitación como la serie de cambios bioquímicos y fisiológicos requeridos por el espermatozoide para liberar el contenido acrosomal. Dichos cambios son tales como:

- Pérdida de proteínas o sustitución por otras de menor peso molecular.
- Transformación de los fosfolípidos, disminución de la relación colesterol/ fosfolípidos.
- Cambios en la fracción glucídica de las glucoproteínas.
- Movilidad de lípidos y proteínas.

Actualmente no se conocen todos los sucesos implicados en el complejo proceso de la capacitación. Se diferencian las siguientes etapas:

- Fluidificación de la membrana celular debido a modificaciones de la estructura lipídica.
- Flujo de Ca^{++} hacia la cabeza y flagelo del espermatozoide.
- Generación de cantidades controladas de especies reactivas de oxígeno.
- Fosforilación de proteínas en los residuos de serina, treonina y tirosina.

El espermatozoide

En condiciones *in vivo* los espermatozoides móviles se separan del resto del eyaculado por migración activa a través del moco cervical.

En la capacitación, el espermatozoide adquiere tres características:

- *Reacción acrosómica.*
- *Unión a la zona pelucida del ovocito.*
- *Hipermovilidad.*

2.1. Reacción acrosómica.

El acrosoma es una organela tipo lisosoma localizada en la región anterior de la cabeza del espermatozoide por debajo de la membrana plasmática, como un casquete sobre el núcleo. El acrosoma contiene muchas enzimas que quedan al descubierto con la reacción acrosómica, que consiste en la liberación del contenido acrosomal inmediatamente antes de la fecundación. Esta reacción es de exocitosis, la fusión de una vesícula intracelular de almacenamiento con la superficie interna de la membrana celular, seguida de la liberación del contenido de la vesícula. Esta reacción requiere la entrada de iones calcio, la salida de iones hidrogeno, un aumento del pH y la fusión de la membrana plasmática con la membrana del acrosoma, lo que permite el contacto con las enzimas y favorece la salida de las retenidas por la membrana interna del acrosoma. Para que un componente de la zona pelucida del ovocito provoque la reacción acrosómica es necesario el contacto del espermatozoide con dicha estructura ovocitaria. Se cree que este componente es un receptor de glicoproteínas espermáticas que tendría una doble función: unirse al espermatozoide e inducir la reacción acrosómica.

2.2. Fusión espermatozoide-ovocito.

La capacidad de unión de la membrana plasmática del espermatozoide con la del ovocito se desarrolla durante o después de la reacción acrosómica. El contacto inicial entre espermatozoide y ovocito es un proceso mediado por receptores. La zona pelucida está compuesta por glucoproteínas secretadas

por el ovocito llamadas ZP1, ZP2 y ZP3 de las cuales la más abundante es ZP3 y el principal fijador para el espermatozoide. Para que el espermatozoide se una es necesario que reconozca el componente carbohidrato de la molécula fijadora de las glucoproteínas específicas para la especie. Después de la unión, el componente peptídico de la glucoproteína receptora desencadena la reacción acrosómica. Al menos uno de los receptores de la cabeza del espermatozoide es una tirosinquinasa activada por la unión a la glicoproteína ZP3 y que inicia la reacción acrosómica. Esta interacción sigue los principios generales de la unión y actividad hormona-receptor. En el caso del espermatozoide y el ovocito, en el reconocimiento interviene una enzima de la superficie del espermatozoide que queda expuesta en el proceso de capacitación.

2.3. Hiperactivación espermática.

Para la fecundación, el espermatozoide desarrolla un movimiento peculiar, llamado hiperactivación, que se caracteriza por una pequeña velocidad de progresión y un rápido movimiento in situ con un gran desplazamiento lateral de la cabeza. El aumento de la movilidad, debido al estado de hiperactividad, contribuye al último avance hacia el ovocito. Es posible que esta movilidad sea en parte el resultado de una interacción con el epitelio de la trompa, que le aporta mayor velocidad y mejor orientación, y también impide que los espermatozoides se adhieran y queden atrapados en el epitelio de la trompa.

6.4. COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

La membrana plasmática espermática juega un papel fundamental en el éxito de la fecundación desde la reacción acrosómica hasta la fusión de la membrana oocito-espermatozoide. *Los lípidos espermáticos parecen ser importantes para la viabilidad, maduración y función de los espermatozoides.* Se ha observado que la fluidez de la membrana y la composición de los fosfolípidos de membrana puede modificarse durante la maduración epididimaria. Los espermatozoides pueden ser susceptibles al daño de la peroxidación por su alto contenido de AG polinsaturados y a la falta relativa de

El espermatozoide

enzimas citoplasmáticas para rescatar las especies reactivas de oxígeno que inician la peroxidación lipídica. La consecuencia mayor de la peroxidación lipídica es un cambio en la fluidez de membrana que hace que se inhiba eventos que ocurren durante la fusión de los gametos (18).

Se sabe que los ácidos grasos polinsaturados están implicados en la fluidez y en la integridad de la membrana plasmática.

El ácido docosahexaenoico (DHA) es el ácido graso más común que compone la membrana espermática. Formado por una cadena larga con 22 carbonos de la serie omega 3, con 6 insaturaciones, presente de forma fisiológica en los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides. Tiene un papel fundamental en la motilidad de los espermatozoides, además optimiza la fluidez de la membrana que es esencial para la fusión de oocito-espermatozoide durante la fecundación. A esto hay que añadir que tiene un efecto antiinflamatorio en los túbulos seminíferos y en el epidídimo y que gracias a su capacidad de absorber los radicales libres posee efecto antioxidante. Este aumento de la fluidez de la membrana debido al gran número de dobles enlaces en el DHA, hace susceptible al espermatozoide a que las especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica lo dañe. El DHA es susceptible a la peroxidación in vitro si se compara con otros ácidos grasos, y sus concentraciones son dependientes de la dieta (19).

El ácido araquidónico (AA) es otro ácido graso polinsaturado que forma parte de la membrana plasmática del espermatozoide. Formado por una cadena larga con 20 carbonos, presente de forma fisiológica en los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides. Por la acción de la fosfolipasa A2, tiene acción pro-inflamatoria. Se ha visto que juega un importante papel en la capacitación y en la reacción acrosómica (19).

Investigadores estudiaron en tratamientos in vitro, espermatozoides humanos con altos niveles de ácidos grasos insaturados, incluyendo AA y DHA (19). En éstos espermatozoides se observó un incremento en la formación de ROS, induciendo un daño en la peroxidación lipídica y una disminución de la motilidad espermática. Estos autores observaron que la producción de ROS no

Introducción

se bloquearía por inhibidores de la ciclooxigenasa o lipoxigenasa, vías del metabolismo del AA o por inhibidores de membranas de sistemas redox .

Otros investigadores también observaron que se producen ratios mayores de AA/DHA en espermatozoides con astenozoospermia, comparados con normozoospermia. Esto sugiere que es necesario un balance entre los niveles de AA y DHA para mantener la vitalidad espermática en vivo.

Uno de los biomarcadores de estrés oxidativo es la malonildialdehído (MDA) un producto final de la peroxidación lipídica. Las cadenas acyl del DHA que forman parte de los fosfolípidos de las membranas espermáticas son especialmente susceptibles al ataque de los ROS induciendo la formación de MDA y 4-hydroxynonenal. Ambas, son moléculas tóxicas que pueden causar alteraciones y mutaciones en el ADN (19).

Se han observado niveles mayores de MDA en espermatozoides y en el plasma seminal de varones astenozoospermicos comparados con normozoospermicos (19). También se ha descrito niveles mayores de MDA en espermatozoides y en el plasma seminal de varones astenozoospermicos y oligoastenozoospermicos. comparados con normozoospermicos (19). También se ha observado niveles mayores de MDA en espermatozoides y en el plasma seminal de varones con azoospermia no obstructiva, asteno- y teratozoospermia, pero no en varones con azoospermia obstructiva comparado con varones fértiles (19).

CAPÍTULO 7. EL SEMEN

7.1. ÓRGANOS QUE PARTICIPAN EN LA ELABORACIÓN DEL SEMEN

El semen es un líquido que contiene en suspensión los espermatozoides. Los espermatozoides se producen en el testículo en dos etapas que duran unos 60 días:

1. *La espermatogénesis*, que es la producción de las espermátidas a partir de las células madre.
2. *La espermiogénesis*, que consiste en una modificación morfológica de la espermátida en espermatozoide, con formación particularmente del acrosoma y del flagelo.

En los testículos, los espermatozoides son inmóviles o móviles *in situ* y no fecundantes. Son evacuados hacia el epidídimo por los conductos espermáticos intratesticulares (túbulos rectos, rete testis) (20).

En el epidídimo se produce al mismo tiempo, reabsorción y secreción. Sólo aquí los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su aptitud para la fecundación. Como la secreción de los espermatozoides entre dos eyaculaciones es continua, son almacenados en la cola del epidídimo. En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides, es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores, 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.

Se distinguen distintas fases del eyaculado:

El semen

- El *preeyaculado*, en la cual vierten las secreciones de las glándulas bulbouretrales y glándulas de Littre. Su función será la de lubricar la uretra como preparación de la eyaculación.
- *Primera fracción del eyaculado*, donde vierten las secreciones de la próstata que contribuye al eyaculado con un porcentaje entre el 15 y el 30% del volumen final y las procedentes del testículo y epidídimo que aportan entre un 5 y un 10%.
- *Segunda fracción del eyaculado*, constituida por las secreciones procedentes de las vesículas seminales que aportan entre un 50 y un 70% del volumen final.

7.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PLASMA SEMINAL

Los componentes bioquímicos de cada fracción son:

a) Marcador de la próstata (Primera Fracción del eyaculado)

- *Citrato*. Es el anión principal y actúa como quelante de cationes. Existe una estrecha correlación entre las concentraciones de zinc y citrato.
- *Zinc*. Es un catión específico del plasma seminal dotado de poder bactericida. Su papel es estabilizar la condensación de la cromatina. Es transportado por el citrato y las proteínas.
- *Fosfatasa ácida*. Es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos. La isoenzima hallada en el esperma es específica de la próstata.

b) Marcadores del epidídimo (Primera Fracción del eyaculado)

- *L-carnitina*. Está en dos formas en el esperma: 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*. Es una hidrolasa que está en dos formas en el esperma: una forma ácida de origen prostático y una neutro epididimaria. En el epidídimo desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides. Sólo es segregada en el cuerpo del epidídimo. Existe una débil secreción extraepididimaria, inferior al 10%.

c) Marcador de las vesículas seminales (Segunda Fracción del eyaculado)

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.

CAPÍTULO 8. ESTILO DE VIDA Y ESTERILIDAD

El impacto sobre la fertilidad del estilo de vida y de la exposición a factores ambientales, tales como agentes físicos, sustancias químicas y tóxicos medioambientales, es un grave problema en nuestra sociedad actual (21).

- **Estrés**

Científicos de la Universidad Estatal de Ohio (EE UU) sugieren por primera vez que el estrés antes de la concepción podría desempeñar un papel importante en la infertilidad. Sus conclusiones se publican en la revista *Human Reproduction*. Los expertos han detectado que las mujeres con altos niveles de alfa-amilasa, indicador biológico del estrés, medido en la saliva, son un 29% menos propensas a quedarse embarazadas y tienen más del doble de probabilidades de sufrir lo que se conoce en la práctica clínica como infertilidad. Además, los autores detectaron que este efecto podría ser clínicamente significativo, ya que está asociado con un doble riesgo de infertilidad respecto al resto de las mujeres.

- **Irradiación y campos electromagnéticos:**

Los efectos adversos de la radiación, tanto para el hombre como para la mujer, han sido demostrados. La radiación en forma de rayos X o gamma puede ser devastadora para las células sensibles del cuerpo humano, incluidas las células germinales y de Leydig, en función de la edad y la dosis recibida. *Pero un aspecto cotidiano, que toma cada vez más relevancia es el potencial daño producido por las ondas electromagnéticas de radiofrecuencia utilizadas en los teléfonos móviles.* Existen numerosos trabajos que demuestran que este tipo de radiación posee un efecto adverso sobre la motilidad progresiva espermática, viabilidad, morfología y recuento, unión del espermatozoide a la zona, o aumento de las ROS.

- **Calor:**

Las profesiones que someten el organismo a temperaturas elevadas pueden originar daño en el ADN de las células germinales e inducir aneuploidia en el

espermatozoide y aberraciones estructurales cromosómicas. El calor disminuye el número, la vitalidad y la movilidad de los espermatozoides mediante bloqueo de la espermatogénesis, apoptosis de las células germinales, alteración de las células de Sertoli y trastorno de la función epididimaria.

▪ **Contaminación del aire:**

Contaminantes como el dióxido de azufre, monóxido de carbono, dióxido de nitrógeno, partículas de ozono, o gases procedentes de los vehículos de motor o emisiones industriales, etc., han sido relacionados tanto con la disminución de la fertilidad masculina, al afectar a la morfología, motilidad y fragmentación del DNA espermático, como con la aparición de sucesos adversos obstétricos (abortos, prematuridad, muerte fetal).

Las ciudades de Madrid, Barcelona, Valencia y Murcia son las que superan habitualmente en España los límites recomendados por la OMS, en cuanto a la contaminación del aire, además de sobrepasar la normativa europea sobre medio ambiente. Según el informe anual sobre la calidad del aire presentado por Ecologistas en Acción, el 95% de los españoles respiran aire contaminado en España durante 2014, según los baremos de la OMS, y 27.000 murieron por enfermedades derivadas de esta circunstancia. El informe incide en que los contaminantes a los que más están expuestos los habitantes de las urbes son el dióxido de nitrógeno, el ozono troposférico y el dióxido de azufre, este último procedente de la contaminación de las refinerías. El ozono troposférico se forma en la atmósfera junto con la luz solar y otras sustancias peligrosas como el óxido de nitrógeno (Diario La Verdad de Murcia, 24-06-2015).

▪ **Exposición a pesticidas y solventes:**

Los trabajadores que utilizan pesticidas en las regiones agrícolas e invernaderos, tienen peores parámetros seminales y pueden llegar a disminuir su concentración espermática hasta en un 60%. Los solventes orgánicos, compuestos volátiles que se utilizan como plastificantes, productos de limpieza o en combinación con otros agentes para disolver materias primas (benceno, tolueno, xileno, estireno), son también perjudiciales para la salud reproductiva. Entre los solventes orgánicos, los éteres de glicol producen una alteración de la

función espermática en el varón mediante una apoptosis masiva, un bloqueo de la diferenciación germinal y una atrofia de los túbulos seminíferos y testiculares, y pueden provocar una oligoastenospermia.

- ***Exposición a plásticos:***

Los ftalatos (plastificantes que dan flexibilidad y durabilidad a productos de PVC), han sido relacionados con reducción en la calidad seminal y con la fragmentación de ADN espermático.

- ***Exposición a metales pesados:***

Metales como el plomo, mercurio, boro, aluminio, cadmio, arsénico, antimonio, cobalto, y litio, han sido considerados tóxicos para la reproducción. El plomo puede alterar el inicio de la pubertad, disminuir la fertilidad en general y provocar patología obstétrica. Los trabajadores con altos niveles de plomo en la sangre tienen daños elevados en el ADN espermático. El mercurio puede afectar negativamente la reproducción en los seres humanos que consumen determinados alimentos, mariscos generalmente contaminados. Se le ha relacionado con alteraciones en la espermatogénesis y en el desarrollo fetal.

- ***Tabaco:***

Se observa un aumento del tiempo necesario para concebir en los varones fumadores, de forma dependiente de la dosis, así como una alteración de los parámetros espermáticos (número, movilidad, formas típicas).

- ***Fármacos:***

Los productos de quimioterapia, empleados en el tratamiento del cáncer o de enfermedad benigna, son potencialmente tóxicos para la espermatogénesis, sobre todo los alquilantes (azoospermia potencialmente irreversible). La yodoterapia empleada en el cáncer de tiroides puede provocar una oligoespermia reversible. Algunos inmunosupresores (azatioprina, sirolimús, tacrolimús), medicamentos hormonales (inhibidor de la 5 alfa-reductasa), antirretrovirales, antidepresivos (inhibidores de la

recaptación de serotonina, tricíclicos) y antiepilépticos también estarían implicados.

DISRUPTORES AMBIENTALES EN EL VARÓN

Durante los últimos años estamos asistiendo a un incremento de patologías relacionadas con la salud reproductiva del varón. *En algunos países europeos cerca de un 20% de la población joven presenta valores de parámetros seminales por debajo de los niveles de referencia establecidos por la OMS, lo que probablemente afectará a su fertilidad.*

El problema de fertilidad masculina podría deberse al padecimiento, del llamado síndrome de disgenesia testicular (TDS), de origen prenatal, que tiene como consecuencias clínicas tan dispares como cáncer de testículo, pobre calidad seminal, o malformaciones neonatales tipo criptorquidia e hipospadias. El aumento en la frecuencia de estas patologías sugiere que el TDS pudiera estar asociado a factores medioambientales o cambios en el modo de vida, más que a cambios genéticos. Eso significaría que una parte importante de estos desórdenes son intrínsecamente prevenibles, siempre que la causa(s) pueda ser identificada (22).

En 2001, Skakkebaek publicaba un artículo en la revista "Human Reproduction" en el que sugiere la hipótesis patogénica del TDS, la cual afirma que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo, variaciones sutiles de los niveles hormonales pueden dar lugar a una distribución anómala de células funcionales y parenquimatosas que conducen a disfunción orgánica y, en última instancia, a enfermedad clínica. La hipótesis incluye, además, como posible causa etiológica, factores ambientales y aquellos relativos al estilo de vida que determinan la exposición a sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal (disruptores endocrinos).

Estos factores exógenos tendrían un mayor peso en la asociación causal que otros factores endógenos o de base genética, aunque no excluye, una posible predisposición particular de algunos individuos que podría potenciar el papel de los factores ambientales.

Introducción

El término disruptor endocrino engloba a un grupo sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso, incluyendo entre otras, sustancias con propiedades estrogénicas y/o antiestrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción de estradiol), androgénicas y/o antiandrogénicas (mimetizadores o antagonistas de la acción de los andrógenos), o mimetizadores o antagonistas de las hormonas tiroideas. En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no atribuyen efecto alguno.

Muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido, y ser empleados aun hoy día, en grandes cantidades y sin protección medio ambiental especial. Algunos compuestos son bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y caracterizados COPs (contaminantes orgánicos persistentes).

Otros parecen no acumularse pero su presencia como contaminantes en el entorno (agua, aire, alimentos, utensilios) es tan frecuente que la exposición diaria está asegurada.

Los disruptores endocrinos alcanzan el organismo humano fundamentalmente a través de una exposición ambiental y posiblemente a dosis bajas, en la mayor parte de los casos. La principal vía principal de entrada es la dieta, no solo por el consumo de productos vegetales contaminados con pesticidas, sino por la ingesta de productos de origen animal que contienen grasas donde se han acumulado los compuestos liposolubles o por la contaminación alimentaria durante el procesamiento y envasado de los alimentos. La diversidad de fuentes de exposición y la gran variedad de compuestos químicos dificulta las medidas de prevención de la exposición.

La hipótesis de disrupción endocrina sugiere que la exposición humana a algunos contaminantes ambientales, introducidos en el medio por la actividad humana, se comportan como hormonas, alterando la homeostasis hormonal y originando un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas, lo que resultaría en problemas de desarrollo y de funcionalidad de los sistemas hormonales.

La exposición humana a disruptores endocrinos con actividad hormonal/anti-hormonal, podría conducir a alteraciones en la salud reproductiva del varón, resultando en enfermedades diversas que van desde las malformaciones del tracto genitourinario, la mayor frecuencia de cáncer de testículo y la merma de la calidad seminal con disminución de la fertilidad. La evidencia epidemiológica que relaciona exposición a disruptores endocrinos y salud reproductiva masculina es escasa.

CAPÍTULO 9. ESTRÉS OXIDATIVO

9.1. INTRODUCCIÓN

La importancia del EO en la etiología de la infertilidad masculina fue descrita en 1943 por el andrólogo John MacLeod, quien demostró que la adición de catalasa podía mejorar la movilidad del espermatozoide incubado bajo condiciones aeróbicas. Los RL son importantes tanto para explicar la función normal como la patofisiología del espermatozoide humano (11).

El oxígeno (O₂) es el segundo elemento más abundante en la atmósfera (21%), apareció hace aproximadamente 2500 millones de años y se formó a partir de la liberación hecha por algas verde-azules al desdoblar el agua para obtener los átomos de hidrógeno esenciales para su crecimiento. Así, la tierra pasó de ser un medio reductor a un medio oxidante.

En forma paralela, y como un mecanismo para hacer frente al nuevo ambiente oxidante, un grupo de organismos evolucionaron a la par con los cambios ocurridos en la atmósfera. Este proceso evolutivo se pudo dar gracias al desarrollo de eficientes mecanismos antioxidantes, permitiendo no sólo sobrevivir en este ambiente oxidante sino emplear el O₂ para la producción de energía en reacciones metabólicas de oxidación (23).

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben el daño oxidativo a una molécula susceptible. El efecto benéfico del O₂ está en el hecho de que es un receptor universal de electrones al final de la cadena respiratoria celular. Sin embargo, han sido descrito efectos negativos de una exposición prolongada al O₂ (23).

La producción de ERO es mantenida en equilibrio gracias a la presencia de sustancias antioxidantes sintetizadas en las células a partir de minerales principalmente, los que constituyen el sustrato para la producción de estas

enzimas antioxidantes, como son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT) (23).

Todas las células vivas están en condiciones normales expuestas a un nivel de estrés oxidativo. En el caso del espermatozoide humano niveles adecuados de ERO son importantes para su funcionamiento normal. Él mismo sufre procesos controlados de oxido-reducción durante: la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica.

Bajo circunstancias fisiológicas, la actividad redox de los espermatozoides, es mediada por el AMPc y la fosforilación de la tirosina, eventos bioquímicos que están asociados con la capacitación espermática.

Además de este papel biológico, el espermatozoide humano también parece sufrir estrés oxidativo, con impacto sobre la normalidad de sus funciones y sobre la integridad de su DNA nuclear y mitocondrial.

En condiciones normales el aparato genital masculino tiene un potente sistema de defensa antioxidante, pero si son excesivos los niveles de moléculas pro-oxidativas en el aparato genital masculino, esas defensas pueden ser perjudiciales y potencialmente productoras de infertilidad masculina. Se ha descrito que los espermatozoides, neutrófilos y macrófagos activados generan ERO que producen la peroxidación de los lípidos. Ante un exceso de EROs se desequilibra el sistema antioxidante del plasma seminal, y debido al estrés oxidativo, la peroxidación lipídica es desmedida, dañando la estructura, integridad y funcionalidad de las membranas (24).

El espermatozoide fue una de las primeras células en la cual se demostró la generación de ERO. Esta actividad ha sido hasta ahora confirmada en espermatozoides de todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo la rata, el ratón, el conejo, el caballo, el toro y además en los espermatozoides humanos (25).

Las ERO pueden incidir negativamente sobre la fertilidad masculina a través de dos mecanismos fundamentales. El primero de ellos es el daño que provocan a la membrana espermática, lo cual da lugar a una reducción de la motilidad y habilidad del espermatozoide de fusionarse con el óvulo. El segundo es por el daño que las ERO ejercen directamente sobre el ADN espermático (16).

9.2. RADICALES LIBRES

Desde el punto de vista químico, los radicales libres (RL) son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad.

Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar.

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (26).

Los RL tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (26).

El metabolismo normal de cada célula es una fuente importante de RL, pero además también se producen por influencias externas, cuando nuestro organismo recibe el impacto de diversos contaminantes tales como, los gases procedentes de los escapes de los automóviles, la contaminación ambiental y

el humo del cigarrillo, algunos productos de limpieza, pesticidas, algunos fármacos, el ejercicio físico excesivo o los rayos ultravioletas del sol (26).

El O₂ es esencial para la vida de los organismos aerobios y su mayor parte (98%) es utilizado para la generación de energía, la cual es liberada durante las oxidaciones biológicas y almacenadas por las células en forma de ATP.

El O₂ actúa como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Una consecuencia directa de este proceso es que en el intermedio se forman varias moléculas con diferentes grados de oxidación, algunas de las cuales también pueden entregar uno o dos electrones al O₂ y producir intermediarios parcialmente reducidos. *Una consecuencia de este proceso es la producción de intermediarios parcialmente reducidos que son los RL llamados Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).*

Las ERO reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones en cadena que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

Las principales especies reactivas del oxígeno (EROs) o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (OH⁻)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Anión superóxido (O₂⁻)
- Oxígeno singlete (1O₂)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

Los radicales libres del oxígeno (26), se clasifican de la siguiente forma:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios.

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta. Estos son: el anión superóxido (O_2^-), el radicalhidróxilo (OH^-) y el óxido nítrico (NO) (23).

El *anión superóxido* (O_2^-) es la fuente más importante en la cadena respiratoria mitocondrial. Durante este proceso se puede reducir parcialmente el O_2 en dos lugares de la cadena: uno, por acción de la NADH-deshidrogenasa, primera enzima de la cadena respiratoria, y otro, como consecuencia de la auto-oxidación de la coenzima Q o ubiquinona. Otra fuente de O_2^- la constituye la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos al producirse el “estallido respiratorio” en una reacción iniciada por la NADPH-oxidasa, se produce un consumo del O_2 y en su reducción se produce O_2^- .

El *radical hidroxilo* (OH^-) se forma a partir de la reacción de H_2O_2 con O_2^- en presencia de hierro y en menor grado de cobre, en lo que se conoce como reacción de Fenton. También pueden intervenir, níquel o cobalto como agentes reductores formando OH^- a partir de H_2O_2 . El OH^- es uno de los oxidantes más potentes que existen, capaz de sustraer átomos de hidrógeno de cualquier molécula biológica, por ejemplo, ADN, lípidos y proteínas.

2. Radicales libres orgánicos o secundarios.

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un tanto más larga que los primarios y los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.

Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete ($1O_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso, el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos.

El *peróxido de hidrógeno (H_2O_2)*, ha sido identificado como un agente citotóxico en los medios donde se ha expuesto la célula a la acción de O_2^- . Químicamente, el H_2O_2 es una molécula estable no radical, pero su comportamiento es similar a un radical libre, se forma a partir de la dismutación del O_2^- en una reacción catalizada por la SOD.

Cierta cantidad de oxidasas en los peroxisomas citoplasmáticos también están en capacidad de producir H_2O_2 en forma directa. De otra parte, se genera H_2O_2 por la transferencia de electrones al O_2 mediante sistemas enzimáticos, entre los que se tienen la NAD-deshidrogenasa y la coenzima Q.

Otra forma de producir H_2O_2 , es por medio de la reacción catalizada por la glutatión reductasa, donde se genera esta sustancia al reducir el glutatión oxidado. La generación continua de O_2^- y H_2O_2 puede inducir en forma indirecta alteraciones en algunas de las estructuras celulares, pero no se ha demostrado que la interacción de las ERO con dichas estructuras sea directa.

El interés está centrado en la capacidad *in vivo* que tienen el O_2^- y H_2O_2 de generar otras moléculas más nocivas que ellos, reacciones que en su mayoría involucran metales de transición.

En espermatozoides humanos, el H_2O_2 causa una elevada fragmentación del ADN, además de reducir su movilidad y capacidad de fusión con los ovocitos.

La peroxidación lipídica (PL) es un ejemplo de daño oxidante en membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos. La peroxidación suele acompañar a diversos procesos degenerativos.

Introducción

El espermatozoide es vulnerable al daño peroxidativo de los RL porque poseen en su membrana plasmática un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados imprescindibles para mantener la fluidez necesaria en la fusión de membrana durante la fertilización (11).

El *peroxinitrito* se produce normalmente como consecuencia de la reacción entre el O_2^- y el óxido nítrico (NO). Es un oxidante casi tan poderoso como el radical OH $^-$. Así mismo se ha observado que células no fagocíticas también tienen la capacidad de producir ERO, incluyendo células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, células tiroideas, células de Leydig u ovocitos, linfocitos B, adipocitos y células tumorales.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales.

Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoaminooxidasa y la NADPH oxidasa. Y entre las sustancias y agentes es conocida ampliamente la relación de los productos cíclicos de naturaleza redox como son el paraquat, diquat, alloxano, estreptozocina y doxorubicina, con los radicales libres.

También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida.

Por último no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el *shock* térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres.

Existen algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son:

- Dieta hipercalórica.

- Dieta insuficiente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia y reperfusión.
- Ejercicio extenuante.

9.3. FUENTES DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno (REDOX), que tienen lugar por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, durante procesos fisiológicos como una reacción inflamatoria controlada y también como respuesta a factores exógenos como la exposición de radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperóxia y exceso de ejercicio e isquemia (27).

Los mecanismos de producción endógena de RL son:

- Durante la respiración celular, los electrones se transfieren del NADH al oxígeno a través de una cadena de tres grandes complejos proteicos llamados NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa.

Existen dos fuentes de generación de O_2^- en la cadena transportadora de electrones: a través de la reducción de la ubiquinona se forma un R) parcialmente reducido a ubisemiquinona (QH), la cual interactúa con el O_2 para producir O_2^- . Este mecanismo es el principal responsable de la producción de ERO en la mitocondria.

El otro mecanismo de producción de O_2^- en la mitocondria es el que involucra la flavoproteína NADH deshidrogenada. El grupo flavina de esta enzima es reducido durante el transporte electrónico al radical flavina semiquinona que al reaccionar con el O_2 produce O_2^- en una reacción similar a la de la ubiquinona (23).

- En la literatura se reportan otras vías por las cuales ocurre la formación de ERO, como es la reacción de éstas con los metales de transición.

Los iones metálicos tienen un fuerte efecto en la química del O_2 y sus productos de reducción. Al producirse la reacción entre el Fe^{2+} con el H_2O_2 puede iniciarse la reacción de Fenton en la que se forma el radical $OH\cdot$. En el caso de iones como el cobre, níquel y cobalto pueden reaccionar de forma similar. El $OH\cdot$ se puede formar también a través de la reacción de Haber-Weiss, donde el $O_2\cdot^-$ reacciona con el H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} . Esta especie radicalaria es altamente reactiva y puede reaccionar prácticamente con cualquier molécula presente en la célula, lo cual se debe a su elevada inestabilidad química.

A través del complejo enzimático xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa ocurre la formación de ERO, lo cual se conoce como la principal fuente de generación de $O_2\cdot^-$ y de H_2O_2 . La xantina oxidasa cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y ácido úrico en la vía catabólica de las purinas y además cataliza la oxidación de gran variedad de sustratos (16).

- Otro mecanismo importante es el del metabolismo del ácido araquidónico por las ciclooxigenasas y lipooxigenasas para formar metabolitos activos biológicamente. Estos metabolitos denominados eicosanoides son potentes mensajeros que modulan la función celular y están involucrados en numerosos procesos fisiopatológicos como la inflamación (16).

La mitocondria constituye la fuente principal de RL. Otras fuentes son las peroxisomas y los leucocitos polimorfonucleares. El peróxido de hidrógeno, el anión superóxido, los nitratos y nitritos son producidos por macrófagos y granulocitos activados y son altamente tóxicos para el espermatozoide. *Dentro de las fuentes exógenas se encuentran las radiaciones ultravioleta, el tabaquismo, el ejercicio, la exposición al ozono, la intoxicación por herbicidas, el abuso de suplementos minerales, el consumo indiscriminado de AGPI y el calor (23).*

9.4. TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

Por la alta inestabilidad atómica de los RL, colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Los RL pueden oxidar biomoléculas como son:

LÍPIDOS: Durante la oxidación lipídica por los RL, el ácido graso, al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, con lo que se propaga y perpetúa el proceso oxidativo. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, y genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo.

PROTEINAS: En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.).

ADN: El daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

9.5. FUENTES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL SEMEN

Los RL que afectan al espermatozoide provienen fundamentalmente de dos fuentes: de los espermatozoides defectuosos y de los leucocitos seminales, encontrados en pacientes con infecciones de las glándulas sexuales accesorias.

En teoría la falta de protección del sistema antioxidante contribuiría a hacer que las células sean más vulnerables a niveles normales de RL o la exposición a una producción excesiva de RL podría ser la responsable del EO en la línea germinal masculina.

Por otra parte, los factores ambientales como el humo del cigarrillo y los metales pesados entre otros, inducen EO sistémico que coincide con una disminución de vitaminas antioxidantes en el plasma seminal y la inducción de daño al ADN en el espermatozoide (11).

1. Espermatozoides:

La producción celular de ERO fue observada por primera vez en espermatozoides de mamíferos a finales de los años cuarenta. La generación controlada de ROS por parte del espermatozoide está asociada con funciones fisiológicas normales mientras que la excesiva producción, parece ser un factor importante a considerar en la infertilidad del varón (25).

Varios investigadores coinciden en afirmar que los gametos masculinos constituyen la principal fuente de esos radicales libres en el semen. Los niveles de oxiradicales producidos por los espermatozoides dañados o defectuosos son superiores a los generados por aquellos morfológicamente normales. En pacientes con oligozoospermia se encuentran valores elevados del anión superóxido (O_2^-) y existe una correlación positiva entre la generación de este radical y la actividad de la diaforasa, oxidorreductasa mitocondrial dependiente de NADH y específica de los espermatozoides. Esta enzima es 3 veces más activa en esos pacientes que en los normozoospermicos (28).

El espermatozoide es una célula con unos importantes requerimientos energéticos debido a su gran movilidad. La mitocondria es el orgánulo encargado de la energía metabólica celular y de la movilidad del espermatozoide.

La producción exacerbada de los EROS en el espermatozoide defectuoso se produce en un 68% a expensas de su producción a nivel mitocondrial,

indicando una importante contribución del orgánulo al estrés oxidativo que sufre el espermatozoide dañado.

2. Leucocitos:

En el plasma seminal, los granulocitos pueden liberar grandes cantidades de ERO como respuesta a una infección y/o inflamación. El grado de daño espermático inducido por los ERO depende de la localización de la reacción inflamatoria, de la duración de la exposición del espermatozoide a estos productos y de la capacidad de la célula espermática para activar su sistema intrínseco de defensa inmunológica.

Un número elevado de leucocitos en el plasma seminal (leucocitospermia) sugiere la presencia de una reacción inflamatoria en el tracto genito-urinario masculino. Numerosos estudios han reportado que el aumento de leucocitos en el plasma seminal afecta negativamente los parámetros seminales, lo que sugiere que la leucocitospermia puede reflejar, al menos en algunos casos, actividad en el tracto genitouretral asociada a una anormal espermatogénesis o pobre viabilidad espermática. Sin embargo, otros no han observado un efecto deletéreo de los leucocitos sobre los parámetros seminales (25).

La correlación negativa que se observa entre la actividad SOD y el número de leucocitos puede estar relacionada con el efecto dañino que los procesos inflamatorios de las vías seminales tienen sobre los lugares de producción de la enzima, lo que disminuiría su actividad. La relación positiva de la actividad SOD con la movilidad es un reflejo de la función protectora de la SOD contra el estrés oxidativo, que se sabe produce un efecto negativo sobre la función de los espermatozoides (29).

Es posible que el aumento de leucocitos sea inducida por el mismo espermatozoide. Un posible mecanismo por el cuál el espermatozoide puede atraer neutrófilos es a través de la activación del complemento y esto puede ocurrir en presencia de infecciones y/o inflamaciones, las cuales a su vez producen activación de los granulocitos y macrófagos.

Es probable que cuando las concentraciones de leucocitos polimorfonucleares (PML) sean bajas, el poder antioxidante presente en el plasma seminal sea suficiente para prevenir el daño peroxidativo al espermatozoide. Sin embargo, con altas concentraciones de PML, la función protectora del plasma seminal puede verse disminuida.

3. Células germinales:

Al igual que los espermatozoides y los glóbulos blancos, las células germinales presentes en el semen generan oxiradicales.

Se ha demostrado que el plasma seminal no produce estas especies reactivas (28). El plasma seminal humano presenta proteínas transportadoras de hierro, transferrina y lactoferrina, que tienen entre sus funciones quelar una molécula de iones de hierro libres que se encuentran cerca del espermatozoide y así reducir el riesgo de reacciones catalizadoras tipo Fenton que favoreciendo la peroxidación lipídica en el espermatozoide (23).

Los espermatozoides defectuosos, particularmente aquellos con excesivo residuo citoplasmático, producen altas cantidades de ERO. Sin embargo, los leucocitos producen 1.000 veces más ERO.

Los hombres con niveles altos de antioxidantes en semen pueden tolerar altos niveles de ERO, mientras que en aquellos sin una adecuada protección antioxidante, los espermatozoides pueden sufrir daño aún cuando la presencia de leucocitos sea baja.

9.6. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTERILIDAD MASCULINA

Se necesitan pequeñas cantidades de RL para desarrollar varias etapas de la fisiología espermática, en concreto para la fosforilización de la tirosínquinasa y el aumento de AMPc, antesala de la hipermotilidad, la reacción acrosómica y la capacitación. Pero el espermatozoide necesita un continuo aporte energético y

su citoplasma es muy rico en mitocondrias, lo que lo hace muy sensible al exceso de los ROS (30).

Se ha demostrado que el anión peróxido (O_2^-) estimula la hiperactivación del espermatozoide humano por medio de vías que inhiben la acción de la SOD. También hay antecedentes que comprueban la activación directa de la fosfolipasa A2 por ERO, posiblemente por medio de una inhibición de la lipocortina.

Así, las ERO facilitan la reacción de acrosoma a través del efecto promotor de la actividad de la fosfolipasa A2, enzima que está presente en el espermatozoide humano y su actividad es estimulada por el calcio y la formación de peróxidos lipídicos dentro de la membrana plasmática (23).

Al parecer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es el más tóxico de estos radicales. Además, los lipoperóxidos y sus productos de degradación (malonildialdehído, hidroxial-kenales, etc.) son altamente tóxicos para los espermatozoides y provocan un daño irreversible a la motilidad.

La peroxidación de los lípidos de la membrana se correlaciona con la disminución de la motilidad espermática y con los defectos morfológicos del cuerpo de los espermatozoides. Bajos niveles de ERO no afectan la viabilidad de los espermatozoides, pero producen la inmovilización de éstos y el daño reversible de su filamento axial, fundamentalmente a través de la disminución del ATP intracelular, lo que lleva a una fosforilación insuficiente de las proteínas de este filamento.

Por otro lado, altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) inducen la lipoperoxidación y causan la muerte celular (28).

Se han observado niveles altos de generación de RL en un 44 a 88% de hombres infértiles. Además, hombres con altos niveles de ERO tienen menos probabilidad de tener hijos cuando se compararon con otros que tienen bajos niveles de ERO (11).

9.6.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (PL)

La PL del espermatozoide humano es considerada uno de los mecanismos claves del daño espermático, con la consecuente infertilidad.

La PL es un indicador de EO en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, derivados de ácidos grasos poli-insaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos. Entre estos se incluyen compuestos carbonílicos, de los cuales el más abundante es el malonildialdehído (MDA). Por esta razón, la cuantificación del MDA es ampliamente usada como indicador de PL.

Las concentraciones aumentadas de lipoperóxidos han sido asociadas con una variedad de enfermedades crónicas en el hombre. El MDA reacciona rápidamente con grupos amino o con proteínas y otras biomoléculas, también forma compuestos con bases de ADN que son mutagénicos y posiblemente carcinogénicos.

Los tipos más comunes de PL son:

- a) la PL no enzimática
- b) la PL enzimática, dependiente de NADPH y ADP.

El comienzo de la PL en espermatozoides susceptibles permite la acumulación progresiva de hidroperóxidos lipídicos en la membrana plasmática del espermatozoide, la cual lo descompone para formar MDA (11).

Los pasos más comunes en la peroxidación lipídica son: iniciación, propagación y terminación.

La iniciación se da con la pérdida de un átomo de hidrógeno de los AGPI en la membrana celular por parte de un OH⁻, así se forma un radical lipídico libre que reacciona con el O₂ generando un radical peroxi (ROO⁻). Al reaccionar el ROO⁻ con las cadenas de ácidos grasos vecinas, se libera hidrógeno y se forman hidroperóxidos (ROOH) inestables en su carga eléctrica, los que tratan de estabilizarse captando átomos de hidrógeno de otros ácidos.

Así, se da inicio a una reacción de propagación o en cadena. Lo anterior determina la pérdida de la integridad de la membrana celular. Cuando se encuentran dos radicales libres se crean puentes entre ellos, deteniendo la reacción, que también puede detenerse por la presencia de moléculas secuestrantes de radicales libres, como son el α -tocoferol, la vitamina C y los flavonoides, entre otras (23).

9.6.2. MECANISMO DE DAÑO ESPERMÁTICO MEDIADO POR ERO

El daño directo inducido por radicales libres puede producirse por tres mecanismos principales:

a) Daño de ADN en espermatozoides maduros inducido por radicales libres generados por espermatozoides inmaduros.

Espermatozoides inmaduros, sobre todo los que retienen restos citoplasmáticos en la pieza intermedia, producen niveles altos de radicales libres. Dado que los radicales libres exportados al medio extracelular tienen una vida media del orden de nano a microsegundos, para que se produzca este daño intercelular, los espermatozoides inmaduros han de estar en íntimo contacto con los espermatozoides maduros. Y esto es lo que ocurre en el epidídimo, donde los espermatozoides están altamente empaquetados.

A través de este mecanismo, los espermatozoides inmaduros productores de radicales libres podrían dañar tanto las membranas como el ADN de espermatozoides maduros resultando en la inducción de necrozoospermia y fragmentación del ADN espermático (31)

b) Daño inducido por radicales libres utilizados en la oxidación de puentes disulfuro a nivel de la cabeza del epidídimo.

A nivel del tramo final de la cabeza del epidídimo existe un mecanismo de reciclaje de radicales libres que se utilizan en la oxidación de los puentes disulfuro de protaminas nucleares y proteínas flagelares espermáticas. Las

alteraciones en la regulación de este reciclaje que conllevan un escape de radicales libres, pueden dar lugar a daño oxidativo de los espermatozoides (31).

c) Daño inducido por radicales libres producidos por las células epiteliales del epidídimo.

Sería el resultante de la producción de radicales libres por parte de las células epiteliales del epidídimo, acoplado a niveles bajos de enzimas antioxidantes, tanto a nivel del epitelio como de la luz del túbulo epididimario.

Enzimas antioxidantes como las diferentes isoenzimas de la glutatión peroxidasa desempeñan un papel central en la protección tanto del epitelio epididimario, como de los espermatozoides a su paso por el epidídimo. Se ha demostrado que el riesgo de este tipo de daño aumenta de forma progresiva de la cabeza a la cola del epidídimo, y que está relacionado con una disminución en los niveles de glutatión peroxidasa y, en particular, de la isoenzima GPX-59 (31).

Pese al efecto beneficioso de las ERO sobre la fisiología espermática, su presencia en exceso hace al espermatozoide particularmente susceptible al daño debido a que sus membranas plasmáticas contienen grandes cantidades de ácidos grasos poli-insaturados susceptibles de peroxidación y a que durante la espermatogénesis se pierde una gran proporción del citoplasma, lugar que se caracteriza por poseer una abundante cantidad de enzimas reductoras que tienen actividad antioxidante.

Esto se suma a que el espermatozoide no dispone de mecanismos para reparar el ADN dañado, siendo el ovocito el encargado de repararlo y muchas veces con poco éxito (32)

Los ERO pueden afectar a:

A. PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

La membrana espermática, rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), principalmente ácido docosahexanoico, le confieren la fluidez suficiente a la membrana plasmática, permitiendo que ésta participe en los eventos de fusión de membranas, evento necesario para la reacción acrosómica y la unión ovocito-espermatozoide.

Las ERO en condiciones fisiológicas podrían iniciar un bajo nivel de peroxidación lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, generando condiciones que mejoran la actividad de la fosfolipasa A2. De esta manera, se crea la fluidez de membrana necesaria para los eventos de fusión ovulo-espermatozoide asociados con la fertilización (23).

La oxidación de la membrana de los espermatozoides humanos, produce una alteración en la fluidez e integridad de esta, con la consiguiente disminución o pérdida de la movilidad, capacitación, reacción acrosómica e interacción con el ovocito para su fertilización.

El daño provocado por la PL (peroxidación lipídica) que explicaría la infertilidad, estaría dado por la pérdida casi de la mitad de los ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente el ácido docosahexanoico (DHA). *In vitro*, cuando la cascada de PL ocurre por estimulación con un promotor como el ión ferroso, el 60 % de estos ácidos grasos se pierden de la membrana. La pérdida del DHA de la membrana probablemente sea el resultado de la descomposición de estos ácidos grasos, más que la escisión enzimática por la fosfolipasa A (11).

B. ADN ESPERMÁTICO

La mayor parte del daño de membrana y del ácido desoxirribonucleico (ADN) que se observa en espermatozoides eyaculados se produce sobre todo en el ámbito del epidídimo. De ahí que en un 90% de los casos, los niveles de daño de ADN que se observan en espermatozoides eyaculados sean muy superiores a los observados en espermatozoides testiculares.

Introducción

Este daño de ADN puede ser inducido directamente por el impacto de radicales libres sobre las cadenas de ADN, o indirectamente a través de la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas (31).

Se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de ERO y la fragmentación del ADN en el espermatozoide de hombres infértiles. La exposición directa del espermatozoide humano a ERO específicas, como H₂O₂, altera la competencia funcional de estas células, así como su integridad genómica.

Las ERO pueden causar hipercondensación del núcleo espermático como resultado de una excesiva oxidación de los grupos sulfhidrilos proteicos. Aproximadamente, el 10% de los espermatozoides provenientes de hombres fértiles poseen niveles medibles de daño al ADN, mientras que en aquellos que provienen de hombres infértiles, este porcentaje oscila entre 20 y 25%.

Las ERO son capaces de dañar el ADN a través de la oxidación de las bases de purina y pirimidina, así como del esqueleto carbonado. Normalmente el ADN se encuentra empaquetado y protegido por las protaminas, y se ha observado que en la infertilidad masculina se conoce que existe un déficit de estas proteínas.

Otro de los daños que provocan es la activación de la apoptosis a través de la degradación enzimática del ADN por acción de las caspasas (16).

Existen dos mecanismos que protegen al ADN espermático del daño de los ROS. Uno es la compacta configuración de la cromatina y el otro la presencia de determinados antioxidantes naturales.

Como los niveles intracelulares de antioxidantes son bajos, es el líquido seminal el que le brinda esta protección. En él se vierten importantes agentes con capacidad de reducir a los ROS, en concreto las enzimas superóxido dismutasas, catalasas y glutatión peróxido reductasas, más otras sustancias no enzimáticas como el glutatión, la taurina, e hipotaurina, la coenzima Q10 y las vitaminas A, C y E.

También se ha descrito que el ovocito fecundado puede contrarrestarlos siempre que su sistema reparador esté intacto. Cuando estos sistemas fallan, se activan fenómenos de apoptosis y se producen daños más extensos en los ADN nuclear y mitocondrial.

Se ha descrito que esta fragmentación puede incluso inducir mutaciones genéticas y ser transmitidas al embrión, lo que justifica el mayor riesgo de aborto, de malformaciones congénitas o de enfermedades en la descendencia.

C. ALTERACIONES EN LA ESPERMATOGENESIS

Un factor importante que contribuye a la producción de ERO por los espermatozoides parece ser la interrupción de la espermiogénesis y la retención de un exceso de citoplasma residual por la metamorfosis del espermatozoide.

La maduración de los espermatozoides ocurre en el epidídimo y este evento es crucial para los cambios estructurales y funcionales de la célula espermática. Alteraciones durante este proceso permitirían un fallo en el sistema antioxidante y oxidativo del espermatozoide, lo cuál determinaría el posterior potencial oxidativo de ese espermatozoide.

Tortolero y cols (25) encontraron una disminución en el contenido de ácido decosahexanoico en el espermatozoide humano durante la maduración epididimaria y sugirieron que este es uno de los pasos fundamentales de regulación genómica de la maduración espermática.

Si este evento no ocurre, el espermatozoide podría presentar retención citoplasmática y una tasa alta de peroxidación lipídica. Una de las consecuencias importantes de la disminución del contenido de DHA durante la maduración espermática en el epidídimo, es la pérdida de DHA de la membrana espermática humana, disminuyendo así la susceptibilidad del espermatozoide al estrés oxidativo.

La retención de residuo citoplasmático por el espermatozoide inmaduro, el cual es liberado prematuramente del epitelio germinal, favorece el aumento de la capacidad de estas células inmaduras para producir NADPH, que sirve como un generador de electrones para la producción de ROS.

Un aumento en la capacidad de las enzimas unidas a la membrana para generar ROS y, posiblemente, un fallo para elaborar inhibidores intrínsecos de actividad de óxido-reducción de la membrana plasmática, podría contribuir al estrés oxidativo expresado por estas poblaciones de espermatozoides inmaduros (25).

9.6.3. FUENTES DE GENERACIÓN DE ROS DURANTE LAS TRA

- *Luz visible.*

La manipulación *in vitro* de gametos y embriones implica una inevitable exposición a la luz (400-700 nm) derivada del microscopio y de la luz ambiental del laboratorio. La luz ejerce un efecto negativo sobre los gametos y sobre los embriones en desarrollo.

El efecto negativo de la luz dependerá de la duración a la exposición, de su intensidad y del espectro de la luz. La luz azul (400-500nm) es más dañina que la luz visible y podría generar peróxido de hidrógeno y alterar enzimas de la cadena respiratoria.

Embriones de ratones expuestos a luz azul tuvieron menores tasas de blastocistos, mayor apoptosis de las blastómeras y altas tasas de ROS en el interior de la morula. El uso de filtros de luz en los microscopios (menores de 500nm), utilizar la mínima luz necesaria para el manejo visual y un tiempo corto de inspección, podría frenar los efectos perjudiciales que tiene (33).

- *Medio de cultivo*

La composición del medio de cultivo durante el cultivo de ovocitos humanos y de los embriones, tiene una influencia directa en la calidad embrionaria y consecuentemente en el éxito de las TRA.

La presencia de iones metálicos (hierro, Fe⁺² y cobre Cu⁺²) en el medio de cultivo podría iniciar la generación de ROS en el interior de la célula. La adición de quelantes metálicos (eg EDTA) podría reducir la formación de ROS, de todas formas, suplementos adicionales (eg albumina) podrían aumentar la carga de oxígeno.

La suplementación del medio de cultivo con antioxidantes (eg ácido ascórbico, alfa-tocoferol) podría aliviar los efectos adversos generados por los ROS sobre los gametos.

- *ph y temperatura.*

La homeostasis intracelular es altamente susceptible a cambios en el pH. Son especialmente susceptibles la síntesis proteica, la función mitocondrial, la regulación del citoesqueleto y el metabolismo celular.

Fluctuaciones de las concentraciones del ion hidrógeno en el medio de cultivo podría influir negativamente en la motilidad espermática, en la maduración ovocitaria y en el desarrollo embrionario. A pesar de esto, para mantener el pH del medio de cultivo, los niveles de CO₂ deberán de ser estables. Bajos niveles de CO₂ incrementarían el pH del medio de cultivo. Incrementos del pH podrían generar EO sobre las células.

El uso de sistemas tampón ayuda al medio de cultivo a mantener el pH. Estos son: sodio, bicarbonato durante los procesos de FIV y HEPES *buffer* para el almacen y el manejo de los espermatozoides.

La temperatura del incubador debería ser mantenida constantemente a la temperatura del cuerpo humano, ya que, incrementos de temperatura, disminuyen el nivel del pH e interrumpen procesos intracelulares y pueden provocar daño celular inducido por ROS (33).

- *Concentraciones de oxígeno.*

Durante la FIV y la ICSI, los embriones son cultivados en laboratorios de RA, normalmente a una concentración de oxígeno por debajo de los niveles

atmosféricos (<20%) o a concentraciones de oxígeno *in vitro* <5% . El cultivo embrionario en concentraciones de oxígeno <5% son más parecidas fisiológicamente a las encontradas en la trompa y en el útero (2-8%).

Las condiciones hiperoxicas podrían favorecer la actividad de enzimas oxidativas dependientes de oxígeno. Concentraciones de oxígeno a niveles atmosféricos podrían generar ROS y ser causa de desarrollo de EO, afectando negativamente la calidad embrionaria. La revisora Cochrane realizó una revisión sistemática de este tema, observando mejor desarrollo embrionario cuando se cultiva a concentraciones de oxígeno del 5%, mejorándose el desarrollo embrionario, las tasas de embarazo clínico y las tasas de nacido vivo.

- *Centrifugación*

En TRA, la centrifugación la cual es fuente potencial de ROS, es un paso rutinario en la preparación seminal durante estas técnicas. Centrifugaciones largas exponen al espermatozoide a altas temperaturas y afectan a los parámetros seminales. Durante la preparación espermática, la adición de antioxidantes tales como la pentoxifilina podría reducir la producción de ROS generada por la centrifugación.

- *TRA*

Durante las TRA, la manipulación *in vitro* de gametos y embriones es una fuente generadora de ROS. La FIV convencional implica largo tiempo de incubación de espermatozoides, ovocitos y sus células del cúmulo debido a que la fecundación se hace espontáneamente. Esto hace que se generen mayores niveles de ROS en comparación con la ICSI, la cual tiene un menor periodo de incubación debido a que el biólogo realiza directamente la fecundación mediante microinyección espermática dentro del ovulo. De todas maneras, la ICSI conlleva un mayor riesgo de exposición del ADN ovocitario a los ROS.

- *Criopreservación*

A pesar del uso de crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides, ovocitos y embriones, el proceso de congelación puede modificar la estructura y la integridad de la célula. La congelación incrementa el daño oxidativo del ADN produciendo en el espermatozoide peor motilidad y viabilidad. La suplementación antioxidante protege al espermatozoide de los efectos de la congelación (33).

9.6.4. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ERO Y LA EDAD DEL VARÓN

Se estudió prospectivamente como influiría la edad en los niveles de EROS en varones sin trastorno seminal. Se evidenció que existe una correlación positiva entre la edad y la presencia de fragmentación del ADN y apoptosis. Esto quiere decir que a medida que aumenta la edad, incrementa la posibilidad del daño oxidativo y por consiguiente podría afectar la fisiología testicular, promoviendo la formación de espermatozoides dañados a partir de las EROs.

En relación al umbral de edad, los trabajos previamente citados mencionan que a partir de los 35-36 años se puede observar un incremento significativo del daño espermático (fragmentación del ADN). Sin embargo, en base a nuestros trabajos anteriores y al presente, encontramos que a partir de los 46 años no solo se incrementa de manera significativa los niveles de fragmentación del ADN, sino también de apoptosis y peroxidación lipídica (Alvarez Sedó, 2012) (32).

CAPÍTULO 10. LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

10.1. LÍPIDOS

Se llama lípidos a un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno.

Tienen como característica principal ser insolubles en agua y sí en disolventes orgánicos como el benceno. Los lípidos forman un grupo de sustancias de estructura química muy heterogénea.

La clasificación más aceptada es la siguiente:

- *Lípidos saponificables*: Los lípidos saponificables son los lípidos que contienen ácidos grasos en su molécula y producen reacciones químicas de saponificación. A su vez, se dividen en:
 - *Lípidos simples*: Aquellos lípidos que sólo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Estos lípidos simples se subdividen a su vez en: Acilglicéridos o grasas y Céridos o ceras.
 - *Lípidos complejos*: Son los lípidos que además de contener en su molécula carbono, hidrógeno y oxígeno, también contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como un glúcido. A éstos, también se les llama lípidos de membrana pues son las principales moléculas que forman las membranas celulares: Fosfolípidos y Glicolípidos.
- *Lípidos insaponificables*: Son los lípidos que no poseen ácidos grasos en su estructura y no producen reacciones de saponificación. Entre los lípidos insaponificables encontramos a: Terpenos, Esteroides y Prostaglandinas.

Las grasas son lípidos saponificables simples, sólidos a temperatura ambiente o líquidos en cuyo caso se llaman aceites. Puede ser:

- *Grasas saturadas*: Son aquellas grasas que están formadas por ácidos grasos saturados (tienen todos los enlaces completos por H). Aparecen por ejemplo en el tocino, en el sebo, etc. Este tipo de grasas es sólido a temperatura ambiente. Son las grasas más perjudiciales para el organismo.
- *Grasas insaturadas*: Son grasas formadas por ácidos grasos insaturados (tienen uno o más enlaces sin completar con H) como el oleico o el palmítico. Son líquidas a temperatura ambiente y comúnmente se les conoce como aceites. Pueden ser por ejemplo el aceite de oliva o el de girasol. Son las más beneficiosas para el cuerpo humano.

10.2. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son moléculas formadas por cadenas de carbono que poseen un grupo carboxilo como grupo funcional. El número de carbonos habitualmente es de número par. Los tipos de ácidos grasos más abundantes en la naturaleza están formados por cadenas de 16 a 22 átomos de carbono.

La parte que contiene el grupo carboxilo manifiesta carga negativa en contacto con el agua, por lo que presenta carácter ácido. El resto de la molécula no presenta polaridad (apolar) y es una estructura hidrófoba. Como la cadena apolar es mucho más grande que la parte con carga (polar), la molécula no se disuelve en agua.

Los ácidos grasos se clasifican en:

A) *Saturados*. Los enlaces entre los carbonos son enlaces simples, con la misma distancia entre ellos ($1,54 \text{ \AA}$) y el mismo ángulo (110°). Esta circunstancia permite la unión entre varias moléculas mediante fuerzas de Van der Waals. Cuanto mayor sea la cadena (más carbonos), mayor es la posibilidad de formación de estas interacciones débiles. Por ello, a temperatura ambiente, los ácidos grasos saturados suelen encontrarse en estado sólido.



Figura 9. Estructura de un ácido graso saturado.

B) *Insaturados*. En ellos pueden aparecer enlaces dobles o triples entre los carbonos de la cadena. La distancia entre los carbonos no es la misma que la que hay en los demás enlaces de la molécula, ni tampoco los ángulos de enlace (123° para enlace doble, 110° para enlace simple). Esto origina que las moléculas tengan más problemas para formar uniones mediante fuerzas de Van der Waals entre ellas. Por ello, a temperatura ambiente, los ácidos grasos insaturados suelen encontrarse en estado líquido.

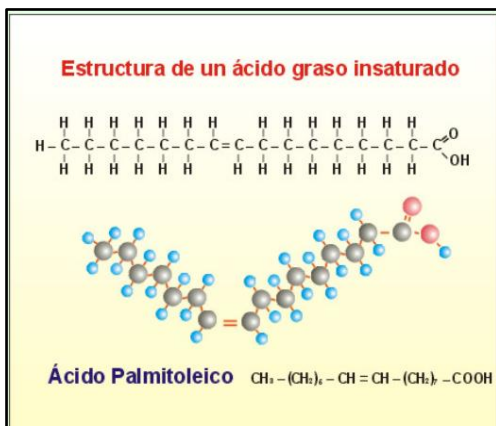


Figura 10. Estructura de un ácido graso insaturado.

Los ácidos grasos esenciales son ácidos grasos poliinsaturados que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos y son necesarios para ciertas funciones que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben obtenerse por medio de la dieta.

Existen dos tipos de ácidos grasos esenciales, los correspondientes a los derivados de la serie omega-6, que se forma a partir del ácido linoleico (AL, C18:2), y los derivados de la serie omega-3, cuyo precursor es el ácido alfa-linolénico (ALA, C18:3).

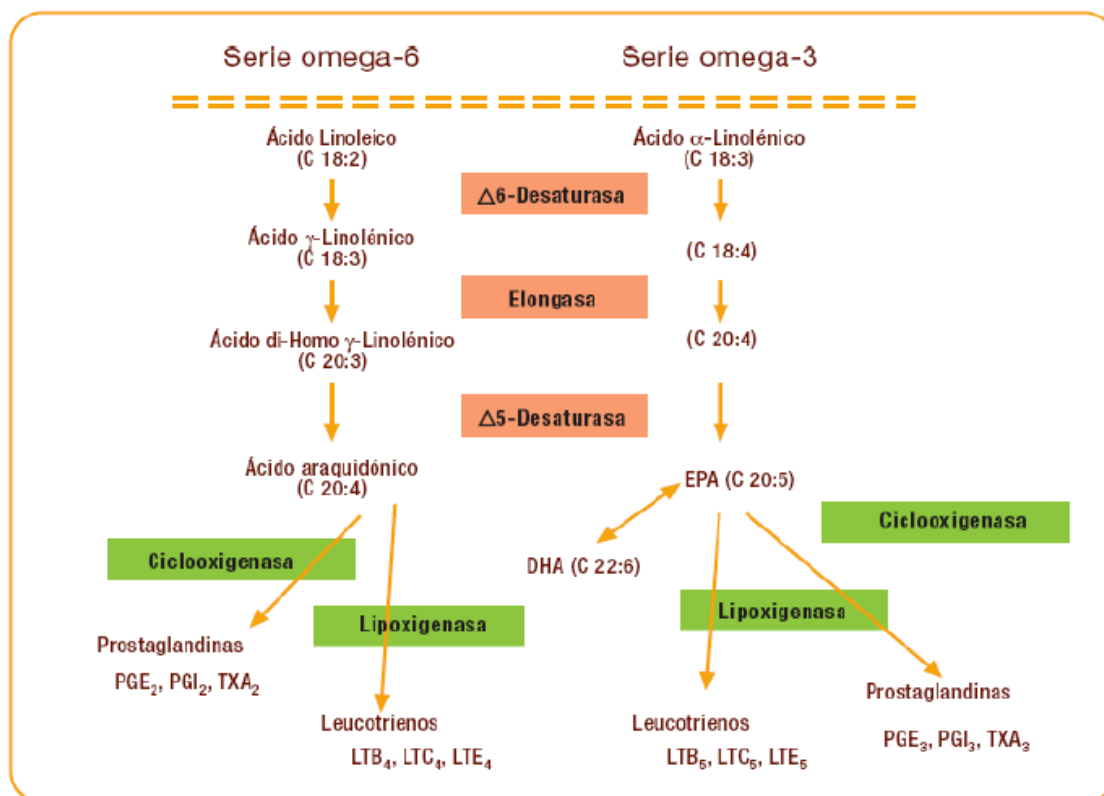


Figura 11. Esquema de la formación de la serie omega-3 y omega-6.

La ingesta recomendada de AL según *DRI (Dietary Reference Ingest del Institute of Medicine)* es de 17 g/día para los hombres y de 12 g/día para las mujeres. La ingesta recomendada de ALA es de 1,6 g/día para los hombres y de 1,2 g/día para las mujeres. La SENC (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria), recomienda un aporte del 5% de la ingesta de energía de la dieta en forma de AL y un 1% en forma de ALA, de este especifica 300 mg/día de DHA, ya que la conversión de ALA en EPA y DHA es escasa.

Para obtener la dosis necesaria de omega-3 (ALA, EPA y DHA) a través de la alimentación se recomienda un consumo semanal de pescado mínimo de 2 raciones de pescado graso (se considera 1 ración de 125-150g de pescado),

con esto se puede alcanzar una media de 500 mg de EPA y DHA /día. Junto con una ración de frutos secos (20-30g de nueces) de 3 a 7 veces a la semana.

Los tipos de AGPI son:

- *Serie omega 3*. El primer doble enlace está situado en posición 3.
- *Serie omega 6*. El primer doble enlace está situado en posición 6.
- *Serie omega 9*. En realidad, no es un ácido graso poliinsaturado, sino monoinsaturado puesto que sólo posee un enlace doble, situado en posición 9.

Estas tres vías metabólicas comparten los mismos sistemas enzimáticos, lo que puede generar fenómenos de competitividad. Así, si se administra DHA exógeno, se produce lo que se denomina una inhibición de sustrato y, consecuentemente, menos ácido araquidónico (el producto final de la serie omega-6) (32,33).

Los lípidos son una fuente energética importante para el organismo, en el adulto se recomienda que el consumo oscile entre 30-35% de la energía total consumida. Se recomiendan menos de un 10% de grasas saturadas, 10-15% de monoinsaturados y de 8-10% de poliinsaturados, como parte de una dieta equilibrada. El ácido linoleico (ALA) y el linolénico (AL) son esenciales, por lo que deben de encontrarse en cantidades de 2-6%.

10.2.1. ÁCIDOS GRASOS SERIE OMEGA 6

Los **tipos** de ácidos grasos omega-6 son:

- Ácido linoleico. 18:2 (n-6)
- Ácido γ -linolénico. 18:3 (n-6)
- Ácido eicosadienoico. 20:2 (n-6)
- Ácido dihomo- γ -linolénico. 20:3 (n-6)
- Ácido araquidónico. 20:4 (n-6)
- Ácido docosadienoico. 22:2 (n-6)

- Ácido adrenico. 22:4 (n-6)
- Ácido caléndico. 18:3 (n-6)

Son un tipo de ácido graso comúnmente encontrados en los alimentos grasos o en la piel de animales. Las fuentes dietéticas de los ácidos grasos omega-6, incluyen: nueces, cereales, pan integral, la mayoría de los aceites vegetales, huevos, aves de corral y aguacate.

Las dietas modernas usualmente tienen una proporción 10:1 de omega-6:omega-3, algunos de 30:1. La proporción sugerida es de 4 a 1 o menor.

Los riesgos de alta concentración o consumo de omega-6 están asociados con infartos al corazón, ACV, artritis, osteoporosis, inflamación, cambios de ánimo, obesidad y cáncer.

Las **Funciones** de los ácidos grasos omega 6 son:

A) *Origen vegetal.* Son ricos en Linoleico y Gamma-linolénico y a partir de éstos, se forman las prostaglandinas con capacidad antiinflamatoria. Consiguen fluidificar la sangre reduciendo el riesgo de trombos, mejorando la circulación y disminuyendo el riesgo cardiovascular y la hipertensión. A partir de ellos, también se forma el ácido graso omega-6 ácido araquidónico.

B) *Origen animal.* En este caso aparecen en forma de araquidónico precursores de las prostaglandinas de la serie 2 que tienen un efecto contrario a las anteriores pues aumentan los procesos inflamatorios y favorecen la coagulación sanguínea. Estos ácidos grasos no son perjudiciales en sí mismos, pues cumplen funciones necesarias en el organismo, pero no hay que excederse en su consumo.

10.2.2. ACIDOS GRASOS SERIE OMEGA 3

La base de los AG omega-3 es el ácido linolénico (ALA). Los diferentes **tipos** de AG omega-3 son:

Introducción

- Ácido alfa-linolénico (ALA). 18:3 (n-3). Cadena corta.
- Ácido estearidónico (SDA). 18:4 (n-3). Cadena corta.
- Ácido eicosatetraenoico (ETA). 20:4 (n-3). Cadena larga.
- Ácido eicosapentaenoico (EPA). 20:5 (n-3). Cadena larga.
- Ácido docosapentaenoico (DPA). 22:5 (n-3). Cadena larga.
- Ácido docosahexaenoico (DHA). 22:6 (n-3). Cadena larga.

Las **Funciones** fisiológicas y beneficios clínicos de los PUFAs n-3 son:

- Presión sanguínea: Descienden la presión sanguínea, por lo que son útiles en la HTA y en la ECV.
- Función plaquetaria y coagulación sanguínea: Descenso de trombos, por lo que son útiles en la ECV.
- Descienden los triglicéridos, por lo que son útiles en las hipertrigliceridemias y en la ECV.
- Función vascular: Mejoran la reactividad, por lo que son útiles en la ECV.
- Ritmo cardíaco: Reducen las arritmias por lo que son útiles en la ECV.
- Descienden la inflamación por lo que son útiles en enfermedades inflamatorias.
- Mejoran la inmunidad por lo que son útiles en trastornos inmunitarios.
- Recambio óseo: Mantienen el recambio óseo, por lo que son útiles en la osteoporosis.
- Mejoran la sensibilidad a la insulina por lo que son útiles en la diabetes tipo 2.
- Crecimiento tumoral: Intervienen en el decrecimiento y supervivencia por lo que son útiles para el cáncer.
- Señalización visual: Interviene en la optimización visual, por lo que son útiles en el desarrollo visual.
- Estructuración cerebral: Intervienen en los procesos cognitivos siendo útiles en el desarrollo cognitivo y en la Enfermedad de Alzheimer.

10.2.2.1. DHA

El **ácido docosahexaenoico (DHA)** es un ácido graso poliinsaturado que contiene 22 carbonos y 6 dobles enlaces a lo largo de la cadena alifática, de los cuales el último doble enlace está a 3 carbonos del terminal metilo. De ahí su designación numérica de 22:6, n-3 o también de omega 3. Dada la presencia de estos seis dobles enlaces no conjugados con grupos metileno bis-alílicos interpuestos, la molécula de DHA adopta una configuración circular.

Esto explica en gran parte su gran entropía y movilidad molecular a nivel celular, tanto esterificado a fosfolípidos de membrana, como en forma de ácido graso libre. La gran movilidad del DHA y su carácter altamente hidrofóbico, que le permite atravesar todo tipo de membranas celulares, explica en gran medida sus efectos terapéuticos y su función reguladora de la fluidez de membrana (31).

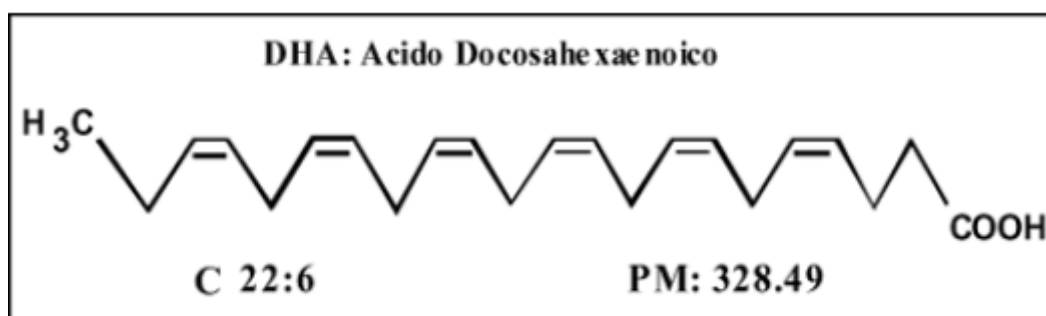


Figura 12. Estructura del DHA.

10.2.2.1.1. ORIGEN NUTRICIONAL Y UBICACION CELULAR DEL DHA

El DHA no está presente en las fuentes nutricionales de ácidos grasos de origen terrestre, aunque sí lo está su precursor más importante, el ALA, quien se encuentra en los aceites vegetales extraídos de ciertas semillas, como es el caso de la soja, la canola o raps modificado, o la linaza.

La fuente más importante de DHA son los organismos vegetales y animales de origen marino. Los componentes del fitoplancton, especialmente aquellos fotosintéticos, lo sintetizan con mucha eficiencia. Los peces y los animales marinos en general (mamíferos, moluscos, bivalvos, etc) lo incorporan a sus

estructuras celulares como parte de la cadena alimentaria, aunque no se descarta que éstos tengan la capacidad de biosintetizarlo a partir de precursores más simples:

Desde el punto de vista de la alimentación humana, los peces, especialmente aquellos de constitución más grasa (jurel, atún, anchoa, sardina, salmón, etc) constituyen la principal fuente nutricional de DHA (34).

El DHA proveniente de la dieta o de la síntesis endógena, se encuentra prácticamente en todos los tejidos. *Sin embargo, es particularmente abundante en tejido cerebral, en los conos y bastoncitos de la retina y en las gónadas, especialmente en los espermatozoides, tejidos en los que puede constituir el 40%-60% de los ácidos grasos poliinsaturados.* También se le puede identificar en el plasma sanguíneo y en la membrana de los eritrocitos, que se consideran como buenos marcadores del estado nutricional general del DHA y también del AA.

10.2.2.1.2. SÍNTESIS ENDÓGENA DE DHA

El hombre y los mamíferos en general, con la excepción de los felinos, tienen la capacidad de sintetizar DHA a partir del precursor ALA. Esto ocurre gracias a un sistema constituido por enzimas elongasas y desaturasas, que aumentan el tamaño de la cadena de carbonos y que introducen nuevos dobles enlaces, respectivamente, a los ácidos grasos precursores.

Estos procesos ocurren en el retículo endoplasmático celular. De esta forma, el ALA tras sucesivas desaturaciones y elongaciones se transforma en EPA y posteriormente en DHA. Sin embargo, recientemente se ha observado que el sistema de síntesis no es un proceso directo ya que el EPA se transforma primero en un ácido graso de 24 carbonos y 6 dobles enlaces (C24:6, omega-3). Este ácido graso es transferido desde el retículo endoplasmático a los peroxisomas donde sufre un proceso denominado retroconversión.

De esta forma el C24:6 es beta-oxidado parcialmente a DHA, el que queda disponible para su utilización metabólica, por ejemplo, para incorporarse a los fosfolípidos que forman las membranas celulares. Se ha propuesto que el DHA

podría sufrir una nueva beta-oxidación para convertirse en EPA. Este proceso sería muy bien regulado y posiblemente constituiría la fuente endógena de EPA para sus funciones reguladoras.

La síntesis de DHA, y en general de los ácidos grasos omega-3, es un proceso interdependiente de la síntesis de los ácidos grasos omega-6. En efecto, ambos precursores, el AL y el ALA compiten por las mismas enzimas ($\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas) en el proceso de transformación a sus respectivos derivados de mayor tamaño de cadena e insaturación.

Sin embargo, estas enzimas tienen mucho más afinidad por los ácidos grasos omega-3 que por los de la familia omega-6, por lo cual se requieren cantidades mucho mayores de estos últimos ácidos grasos para mantener una velocidad de síntesis adecuada a los requerimientos del organismo.

10.2.2.1.3. FUNCIÓN DEL DHA EN LOS TEJIDOS

Se han identificado muchas funciones bioquímicas del DHA, entre las que destacan sus efectos a nivel de la regulación génica, en el control del sistema inmunológico, como un posible segundo mensajero, todas ellas aún poco conocidas desde el punto de vista molecular.

Sin embargo, su efecto en la función de las membranas celulares, a través de la regulación de la fluidez, es el mejor caracterizado.

La presencia de DHA en las membranas, aumenta su permeabilidad, facilitando el movimiento de otras moléculas a través de su superficie o en su interior hidrofóbico. Este efecto es particularmente importante en la formación y función del sistema nervioso y visual de los mamíferos. En el cerebro el DHA participa en la neurogénesis, en la migración de las neuronas desde zonas ventriculares a la periferia, en la mielinización y en la sinaptogénesis. En el órgano visual, facilita el movimiento de la rodopsina en los fotorreceptores permitiendo la transformación del estímulo visual en una señal eléctrica (34).

El *DHA* en el desarrollo del sistema nervioso.

El desarrollo del sistema nervioso y en especial del cerebro, ocurre en el último trimestre del período gestacional. Es aquí donde comienza en forma activa la formación de las neuronas y donde el requerimiento de DHA aumenta considerablemente. No está claro aún si el feto en este estado del desarrollo es capaz de formar todo el DHA que requiere este proceso, por lo cual la participación de la madre aparece como crucial en esta importante etapa del desarrollo.

La madre traspasa activamente al feto sus reservas de DHA, acumuladas principalmente en el hígado y en el tejido adiposo a través de la placenta. La concentración de DHA en el cerebro (donde llega a constituir el 40% del contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga) es mayor que la concentración en el plasma fetal y ésta, a su vez, mayor que la de la placenta y del plasma materno.

Este proceso que ha sido identificado como biomagnificación, es una demostración de la activa transferencia de DHA madre-placenta-feto. La barrera hematoencefálica es impermeable a los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y al colesterol, los cuales deben ser formados por el cerebro. En cambio es permeable a los ácidos grasos omega-6 y omega-3.

La pregunta, aun sin una respuesta definitiva, es si en la etapa gestacional el cerebro puede formar DHA a partir del ALA que le transfiere la placenta, o si requiere de un DHA preformado dada su incapacidad para desaturar y elongar al LNA.

El *DHA* en la función visual.

El tejido visual es una estructura derivada del sistema nervioso y que al igual que el cerebro tiene una extraordinaria capacidad para captar DHA desde el plasma, aunque tampoco está claro si también tiene la capacidad para formar DHA a partir de precursores de menor tamaño.

En la retina, el DHA forma parte de los fotorreceptores de los conos y bastoncitos. Estas estructuras de la membrana, asociadas a la rodopsina, participan en la conversión del estímulo luminoso en un estímulo eléctrico (depolarización de membranas) y en los procesos de transducción de señales que acompañan a este fenómeno.

No hay evidencias que la retina pueda sintetizar DHA a partir de sus precursores. Sin embargo, este ácido graso es continuamente reutilizado en el tejido ya que el recambio de los conos y de los bastoncitos es muy activo.

Estas células desprenden continuamente segmentos de la membrana (10% de su estructura diariamente) de la parte de ésta sensible a la luz (los segmentos externos de los fotorreceptores), que son continuamente fagocitados por las células del epitelio pigmentado de la retina, produciéndose así una activa reutilización de los productos de la fagocitosis, entre ellos del DHA.

10.2.2.1.4. REQUERIMIENTOS METABOLICOS DEL DHA

El cerebro y la retina de los adultos mantienen una cantidad relativamente constante de DHA en su composición lipídica, lo cual indica que estos órganos son a su vez relativamente independientes de las variaciones del aporte dietario de DHA.

En el caso del cerebro, éste podría mantener un aporte constante de DHA a partir de su propia capacidad de síntesis. La retina se proveería de DHA a partir del aporte hepático, aunque este ácido graso estaría sometido a un activo recambio por reciclaje dentro del órgano visual, por lo cual los requerimientos de DHA plasmático serían más bien modestos.

Sin embargo, en la etapa de gestación intrauterina y en el período post-natal, abarcando los primeros dos o tres años de vida, el requerimiento de DHA por parte del cerebro y de la retina parece ser crítico y fundamental para la función posterior de ambos tejidos.

Introducción

Durante el último trimestre del período de gestación los requerimientos de DHA aumentan considerablemente. El feto tiene capacidad para formar DHA en el hígado, el que es exportado hacia el incipiente tejido cerebral.

Sin embargo, aparentemente los requerimientos de DHA exceden a la capacidad de síntesis ya que la placenta capta DHA a razón de 60-70 mg/día desde el plasma materno para transferirlo al plasma fetal. Esta captación no es exclusiva para los ácidos grasos omega-3, ya que se estima que la captación de ácidos grasos omega-6 fluctúa en 500-600 mg/día.

La captación de ácidos grasos omega-3 (principalmente DHA) por parte del cerebro y del cerebelo es mucho más activa durante la vida uterina que después del nacimiento. No ocurre lo mismo con los ácidos grasos omega-6, e incluso omega-9, cuya incorporación continúa en forma muy activa aun después del nacimiento.

El proceso de biomagnificación del DHA, implica una ávida captación y concentración de DHA por parte del feto, lo que significa para la madre una reducción considerable de sus reservas de DHA, por lo cual ella debe suplementar su dieta con este ácido graso o con sus precursores.

Durante el período post-natal, el DHA que requiere el recién nacido es aportado por la leche materna, la que contiene una pequeña pero significativa cantidad de DHA (0,2-0,4% de la grasa láctea) y con una alta biodisponibilidad, pero que varía con las condiciones de alimentación de la madre. Se ha sugerido que las madres embarazadas y en lactación deberían recibir una suplementación de DHA de al menos 300 mg/día.

Se ha demostrado que en los recién nacidos, especialmente en los prematuros, la ausencia de lactancia materna afecta su capacidad cognitiva y de concentración. También se ha observado en niños mayores, déficit de atención.

Estas alteraciones conductuales aparentes, al parecer no se observan en individuos en la misma condición pero que recibieron fórmulas suplementadas con DHA y AA.

En el caso del sistema visual, existen evidencias experimentales que demuestran que el déficit nutricional de DHA disminuye la agudeza visual y probablemente la percepción de los colores. No existen evidencias que asocien la capacidad visual de un individuo con sus capacidades cognitivas y de concentración, aunque ambas se asocian a deficiencias de DHA durante el período perinatal (34).

10.2.2.1.5. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS AGPI OMEGA 3

Hay evidencia sólida y creciente de que un incremento en el consumo de EPA y DHA proporcionaría muchos beneficios importantes e incluso vitales para la salud de los humanos en:

- Prevención de la recurrencia de un infarto cardiaco
- Reducción en enfermedades cardiovasculares
- Desarrollo del cerebro y sistema nervioso
- Artritis reumática
- Trastorno siquiátrico, incluyendo la depresión y esquizofrenia
- Demencia y la enfermedad de Alzheimer
- Psoriasis

El EPA y el DHA son importantes en el sistema cardiovascular. El EPA en particular contribuye a la respuesta antiinflamatoria. Es el componente esencial de un grupo de mensajeros celulares llamado eicosanoides. Éstos afectan la presión sanguínea, coagulación sanguínea, la respuesta alérgica, función inmunológica, secreciones reproductivas y gástricas.

Necesitamos un equilibrio entre los eicosanoides derivados de los EPA, que son antiinflamatorios, y aquellos derivados de los ácidos araquidónicos (AA) omega-6, que son altamente inflamatorios. Un exceso de éstos segundos puede hacer que el sistema reaccione en exceso, resultando en inflamaciones indeseadas (como ocurre en la enfermedad coronaria) y respuestas alérgicas como el asma.

Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga benefician el corazón de las personas sanas, además de aquellos con alto riesgo o de quienes ya sufren, enfermedades cardiovasculares. Hacen que sea menos probable que la sangre forme coágulos causantes de ataques cardíacos y protegen contra latidos irregulares del corazón que causan la muerte cardíaca repentina. Tres grandes ensayos de control han demostrado que reducen los eventos cardiovasculares entre un 19 por ciento y un 45 por ciento.

10.2.2.1.6. PAPEL DEL DHA EN LA FERTILIDAD DEL VARÓN

El DHA es un componente esencial de la membrana espermática que tiene un papel fundamental en la motilidad de los espermatozoides. Además, optimiza la fluidez de la membrana y es esencial para la fusión del ovocito con el espermatozoide durante la fecundación. A esto hay que añadir que tiene efecto antiinflamatorio en los túbulos seminíferos y en el epidídimo, y que gracias a su capacidad de absorber los radicales libres posee efecto antioxidante (31).

Papel del DHA a nivel de la membrana celular espermática

El DHA se encuentra presente en las membranas celulares en tres tipos de fosfolípidos: la fosfatidil serina, la fosfatidil etanolamina, y los plasmalógenos de etanolamina.

Se ha descrito que la presencia celular de DHA se incrementa a medida que el espermatozoide migra desde los túbulos seminíferos al conducto epididimario, así como de la cabeza a la cola del epidídimo (35).

Una deficiente presencia de los PUFAs en la membrana puede llevar a un deterioro de su fluidez y por ello a un defecto funcional en la fusión del espermatozoide con el ovulo, y por tanto de su capacidad de fertilización.

Safarinejad (77) demuestra que las concentraciones de AG omega 3 (ALA, EPA y DHA) se asocia positivamente no solo con la concentración, motilidad y morfología espermática sino también con la actividad antioxidante del plasma

seminal. Así también observa que altos niveles de omega 6 (ácido esteárico y ácido oleico) se han asociado a un descenso de concentración, motilidad y morfología espermática en pacientes con idiopática OAT.

De todo esto se deduce que la composición de AG del total del semen en hombres astenozoospermicos es diferente que en los normozoospermicos.

Los espermatozoides de varones con OAT idiopática tienen menores niveles de PUFAs totales en los espermatozoides, niveles mas altos de omega-6, niveles menores de omega-3 así como niveles más altos en plasma seminal del ratio AG omega 6/omega 3.

Estos resultados demuestran un selectivo déficit en AG omega 3 en el plasma sanguíneo y en espermatozoides de pacientes con idiopática OAT.

El ratio omega-6/omega-3 en la membrana celular de espermatozoides es importante en el mantenimiento de la normal integridad y función espermática. En humanos hay una positiva y fuerte correlación entre motilidad espermática y las concentraciones de DHA en la membrana. Hombres infértiles tienen niveles mayores de ratio AA/DHA y ratio AA/EPA que los hombres fértiles.

Se han detectado efectos deletéreos por el incremento en la dieta del ratio omega 6/omega3. El ratio ideal omega 6/omega 3 es 1:1. Durante los últimos 100 años los AG omega 6 en las dietas occidentales se han incrementado drásticamente. Esto ha provocado un aumento del ratio omega-6/omega-3 de 25:1 a 40:1. Este incremento del ratio en espermatozoides también ha sido responsable del empeoramiento de la calidad seminal (36).

Por tanto, la posibilidad de que dietas con una presencia escasa de los PUFAs n-3 y ricas a su vez en los PUFAs n-6 puedan contribuir a una pobre y limitada calidad del esperma (37).

Estas observaciones junto con otras investigaciones previas sugieren y demuestran el efecto protector y benefactor de la suplementación con DHA en

las características del semen y en la capacidad enzimática antioxidante del plasma seminal en el humano infértil con OAT idiopática.

Papel del DHA en la espermatogénesis

En este sentido se ha descrito igualmente que los niveles del DHA en las membranas de las células germinales podrían jugar un papel importante en la regulación de la espermatogénesis (38).

Otro efecto beneficioso potencial del DHA a nivel testicular sería el de bloquear el efecto oxidativo de los radicales libres sobre los telómeros de los bivalentes durante el proceso de meiosis. Se sabe que durante la meiosis, la sinapsis de los bivalentes durante la recombinación genética se lleva a cabo a través de los telómeros.

Estudios previos realizados en fibroblastos demuestran que los radicales libres pueden inducir daño telomérico y defectos de sinapsis. Este daño telomérico y los defectos de sinapsis derivados del mismo, podrían originarse también en células germinales, dando lugar a anomalías cromosómicas en los espermatozoides. Una vez que se produce la fecundación, estas anomalías podrían dar lugar a alteraciones en la segregación cromosómica durante la división embrionaria, a aneuploidías embrionarias y a una reducción en las tasas de embarazo y un aumento en la tasa de aborto espontáneo.

Por lo tanto, el DHA también podría tener un efecto beneficioso a la hora de prevenir el daño telomérico inducido por radicales libres en los bivalentes y prevenir, al menos en parte, las aneuploidías embrionarias derivadas de alteraciones sinápticas (31).

Papel del DHA como antioxidante

El DHA tiene un excelente perfil como agente antioxidante y puede ser considerado también por este motivo como un suplemento nutricional que puede proteger y mejorar por ello la capacidad fertilizante del semen.

Los espermatozoides humanos son especialmente susceptibles al daño peroxidativo, y la actividad de la SOD les protege de este deterioro. Se ha observado una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de los PUFAs n-3 en el plasma seminal y las actividades enzimáticas de la SOD y de la catalasa.

Dado que contiene 6 dobles enlaces bis-alílicos, el DHA es susceptible de reaccionar con radicales libres. De ahí que *el DHA pueda considerarse como una atrapador de radicales libres, actuando, además de como un agente antiinflamatorio, como un potente antioxidante*. Si bien en condiciones termodinámicas favorables esto podría suponer un riesgo debido a la formación de lipoperóxidos, en condiciones termodinámicas desfavorables, principalmente a temperaturas por debajo de los 37 °C, el riesgo de peroxidación sería mínimo, prevaleciendo su efecto antioxidante.

Estas condiciones termodinámicas desfavorables de bajas tasas de peroxidación son precisamente las que se dan en el testículo donde la temperatura media intratesticular es de 35,7 °C (31).

Papel antiinflamatorio del DHA

Dado que el DHA, al igual que el AA y el EPA, se encuentra esterificado a fosfolípidos de membrana, regula también el contenido celular de AA y EPA, ya que compite con estos ácidos grasos por el lugar de esterificación en la posición n-2 de los fosfolípidos de membrana.

Esto, de por sí, le confiere al DHA un efecto antiinflamatorio, ya que el AA esterificado en la posición n-2 de los fosfolípidos es el sustrato para la biosíntesis de factores proinflamatorios como las prostaglandinas y los leucotrienos.

Además de este efecto antiinflamatorio indirecto, el DHA, en forma de ácido graso libre, ejerce un efecto antiinflamatorio directo a través de los peroxisome

Introducción

proliferator-activator receptors (PPAR), bloqueando la biosíntesis de otros factores proinflamatorios como las citocinas.

Otros efectos celulares del DHA incluyen el aumento en la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de la familia ATP-Binding Cassette (ABC), que participan en el transporte intracelular de ácidos grasos (31).

Además de su efecto beneficioso potencial a nivel del epidídimo como agente antioxidante y antiinflamatorio, el DHA también podría tener efectos beneficiosos a nivel testicular. Dada su acción antiinflamatoria en los PPAR, el DHA podría aumentar la producción espermática parcialmente inhibida por factores proinflamatorios como la interleucina 8 y el factor de necrosis tumoral alfa, que actúan en la célula de Sertoli bloqueando la espermatogénesis (31).

La mayor parte del daño de membrana y ADN que se produce en espermatozoides es inducido por radicales libres y puede ser amplificado por factores proinflamatorios, produciéndose sobre todo a nivel del epidídimo.

Por lo tanto, dadas sus propiedades como agente antioxidante y antiinflamatorio, el DHA podría tener aplicaciones clínicas en la prevención del daño espermático que se puede producir a nivel posttesticular (31).

En resumen:

El daño de membrana y de ADN que se observa en espermatozoides eyaculados, se produce sobre todo a nivel del epidídimo. Este daño está mediado directa o indirectamente por radicales libres. Los factores proinflamatorios amplifican la producción de radicales libres por parte de espermatozoides inmaduros.

El DHA actúa como un agente antiinflamatorio y antioxidante, por lo que, debería prevenir, al menos en parte, el daño de membrana y de ADN que se observa en espermatozoides eyaculados. Esto vendría condicionado no solo por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, sino también por la

facilidad con la que el DHA cruza la barrera hematotesticular dada su alta hidrofobicidad y movilidad molecular (31).

10.2.2.1.7. SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA DEL DHA

Ciertas especies de algas microscópicas que están presentes en el fitoplacton de forma habitual, tienen la capacidad de sintetizar AGPI de la familia omega-3, incluyendo el DHA. Son microorganismos fotosintéticos y heterotróficos pertenecientes al orden de los *Thraustochytriales* (Traustochytridiales), entre las que se encuentra el género *Schizochytrium*.

Estos microorganismos, que miden entre 6 y 8 micras, son capaces de acumular hasta la mitad de su peso en forma de AGPI n-3. Son frecuentes en todos los entornos marinos estudiados y pueden representar hasta el 30% de la biomasa presente en el agua.

Estas especies aparecen habitualmente asociadas a otros animales marinos en calidad de huésped, sin haberse detectado producción de toxinas alguna. Aunque no haya constancia sobre su consumo directo por el hombre, el fitoplacton constituye la fuente primaria de la cadena alimentaria del ecosistema marino.

En primer lugar este material es filtrado e incorporado a los pequeños invertebrados y otros organismos como los moluscos (almejas, mejillones) y posteriormente a los peces, integrándose de este modo en la cadena alimentaria humana.

El aceite procedente de microalga *Schizochytrium* sp. tiene un contenido en AGPI-CL n-3 del 44%. Prácticamente toda la fracción corresponde al DHA (42% del aceite) y únicamente un 1% se encuentra en forma de EPA. El aceite de pescado, en cambio, presenta una fracción de AGPI-CL n-3 alrededor del 32%, menor al aceite de microalgas, donde el 16% del aceite se encuentra en forma de EPA y sólo un 13% en forma de DHA.

Introducción

El aceite rico en DHA procedente de la microalga *Schizochytrium* sp. ha sido aprobado por diferentes organismos internacionales. En 2004, fue notificado en Estados Unidos como *Generally Recognized as safe* por la *Food and Drug Administration* como ingrediente en alimentos. En 2003, recibió en Europa la aprobación como nuevo ingrediente (*Novel Food*) para su uso en complementos de la dieta y en diferentes alimentos.

Aunque el aceite rico en DHA puede obtenerse también del pescado, existe una preocupación creciente relacionada con el contenido de contaminantes ambientales (metil-mercurio, dioxinas y bifenilos policlorados, entre otros) que éste contiene.

Por este motivo, diferentes agencias de seguridad alimentaria como la FDA-USA, aconsejan controlar el consumo de especies como el tiburón, el pez espada, la caballa gigante o el lofolátilo, principalmente en mujeres embarazadas, lactantes y niños.

Además, los crecientes niveles de captura de pescado, debidos al aumento de la demanda, lo convierten en una materia prima no sostenible. Frente a las anteriores limitaciones de consumo de fuentes de DHA, el aceite procedente de la microalga *Schizochytrium* sp. constituye una valiosa alternativa.

CAPÍTULO 11. ANTIOXIDANTES

11.1. GENERALIDADES

Antioxidante es toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato.

El antioxidante al reaccionar con el radical libre (RL) le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

Tienen diferentes mecanismos de acción: unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación).

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, y pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre, hierro, zinc, selenio y manganeso, ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (39).

La deficiencia de antioxidantes en el organismo puede obedecer, entre otras razones, a una dieta deficiente, a enfermedades que reducen la absorción de antioxidantes de la dieta (ej. enfermedad de Cronh), a una nutrición estrictamente parenteral y a situaciones como la diálisis renal.

La recomendación de un estilo de vida sano practicando ejercicio regularmente y una dieta basada en los productos de la dieta mediterránea, parece eficaz para prolongar la supervivencia y reducir ciertas patologías.

Respecto a los tratamientos antioxidantes existen en la literatura resultados contradictorios, siendo necesarios más estudios para definir las enfermedades, el momento y el tipo de la intervención, el perfil del paciente, los antioxidantes y sus dosis adecuadas para que estos tratamientos sean claramente exitosos.

11.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE

En condiciones normales existe un equilibrio entre la generación de radicales libres y su neutralización por los sistemas de defensa antioxidantes. Pero cuando este equilibrio se rompe, bien por la sobreproducción de radicales libres, bien por la deficiencia de los sistemas antioxidantes o por ambas razones, se produce el estrés oxidativo o daño oxidativo, mecanismo general de daño celular que conduce a una alteración en el funcionamiento celular directamente relacionada con la patogénesis de muchas enfermedades que luego detallaremos, y finalmente a la muerte celular (40).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (26).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los RL del oxígeno y las ERO que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.), funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos (26).

Se recomienda manejar con cuidado los niveles de antioxidantes en la dieta ya que una cantidad excesiva podría interferir con las funciones protectoras de la apoptosis y así aumentar el crecimiento tumoral.

Todos los autores coinciden en la necesidad de diseñar nuevos estudios que permitan dilucidar el verdadero papel de los antioxidantes en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, principalmente la patología cardiovascular y tumoral, que es la más relacionada con el estrés oxidativo y con una dieta deficitaria en estas sustancias.

El arsenal antioxidante del semen es:

- *Producción endógena*: Superoxidodismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.
- *Producción exógena*: Vitamina E, vitamina C, vitamina A, glutatión, albúmina, piruvato, taurina, hipotaurina y la fructosa.

La dosis ideal in vivo requerida para que un antioxidante sea efectivo en plasma seminal todavía no se ha determinado (41).

11.3. CLASIFICACIÓN

❖ *SEGÚN SU ETIOLOGÍA:*

Se clasifican en *endógenos*, fabricados por la propia célula, y *exógenos*, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (25).

A. ANTIOXIDANTES ENDOGENOS

A.1. ENZIMATICOS (26).

La actividad de las enzimas antioxidantes depende del aporte nutricional de los llamados minerales antioxidantes, como el selenio, manganeso, cobre y zinc. El mecanismo general de acción de estos oligoelementos es a través de su participación en sistemas enzimáticos, ya sea como parte integrante de la estructura proteica de la enzima o como su activador. Cabe señalar que

Antioxidantes

también ejercen otras funciones antioxidantes independientemente de su incorporación a la enzima.

En el grupo de antioxidantes enzimáticos, se encuentran fermentos que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, por lo que pertenecen al sistema de prevención.

Las tres enzimas que a continuación se van a enumerar forman parte del arsenal antioxidante del semen.

A 1.1. *La superoxidodismutasa (SOD)*

Es la primera línea de defensa contra la toxicidad del O₂, es permeable a la membrana y puede acumularse en la fracción celular donde es producida.

Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides:

- Cu-SOD y Zn-SOD: contienen cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial.
- Mn-SOD: contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial.
- Fe-SOD: contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. Coli*.

Es una enzima que cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido. Está presente en todas las células, con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula. En humanos existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD 1 se encuentra en el citoplasma, SOD 2 en las mitocondrias y SOD 3 en el líquido extracelular. SOD 1 y SOD 3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD 2 tiene manganeso en su centro reactivo.

Las mutaciones en la SOD 1 se han relacionado con la esclerosis lateral amiotrófica y su sobreexpresión se ha relacionado con el Síndrome de Down.

Los otras dos tipos de enzimas no se han relacionado con ninguna patología conocida, sin embargo en ratones la inactivación de SOD 2 provoca la muerte perinatal y la inactivación de SOD 1 causa hepatocarcinoma.

La presencia de SOD en el semen humano está bien establecida y constituye uno de los elementos principales en la protección de las células sexuales masculinas contra el estrés oxidativo. En el plasma seminal la actividad de la SOD es elevada, su valor resulta veinte veces superior al del plasma sanguíneo. Diversos estudios informan que la CuZn- SOD es responsable de 75% de esta actividad y que la SOD 3 lo es de 25%. Ambas isoenzimas tienen como origen primario a la próstata y el epidídimo. La actividad de la Mn-SOD es insignificante en este fluido seminal. Por su parte, los espermatozoides humanos contienen excepcionalmente grandes cantidades de CuZn-SOD y poseen una ínfima cantidad de SOD 3. En estas células la actividad de la isoenzima que emplea el Mn es baja (28).

A.1.2. *La catalasa (CAT)*

Es una metaloproteína tetramérica que contiene 4 subunidades. Y cada una contiene un grupo hemo. Se localiza en la membrana de los peroxisomas y en la mitocondria, aunque se ha observado en el citoplasma de algunos tipos celulares como el eritrocito. Es una de las enzimas más eficientes que se conoce y de las más abundantes. Existen muchas isoformas de la catalasa, la mayoría presentan Fe en su sitio activo (grupo hemo), pero algunas poseen Mn. Esta última se origina principalmente en el plasma seminal, aunque se han encontrado bajos niveles de actividad en los espermatozoides (28).

Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y citosol (eritrocitos).

Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa. Forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas

concentraciones de peróxido de hidrógeno. Esta enzima utiliza el hierro como cofactor y cataliza la formación de agua y O_2 a partir del H_2O_2 . Además, posee actividad peroxidásica, lo que significa que la CAT es capaz de usar una molécula de H_2O_2 como sustrato para ceder electrones y otra molécula de H_2O_2 como oxidante o receptor de electrones.

A.1.3. La glutatión peroxidasa (GP)

Es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual actúa como agente reductor al ceder un átomo de hidrógeno (H^+) y transformarse en glutatión oxidado (GSSG), que a su vez es transformado en GSH por acción de la glutatión reductasa (GRd).

La actividad de la enzima en diferentes tejidos es un indicador del balance nutricional de selenio, ya que este mineral es un componente estructural de la estructura proteica de la enzima.

Se localiza en: citosol (eritrocitos), lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune).

Existen tres formas de GP:

- GP-c o forma celular: tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido.
- GP -p o forma extracelular: presenta afinidad semejante para ambos sustratos.
- GP-PH: Tiene afinidad específica para los lipoperóxidos. Las formas GP-c y GP-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos.

En estudios realizados sobre la infertilidad masculina se ha detectado una disminución de la actividad de estos sistemas enzimáticos, sobre todo de la SOD, sin embargo, algunas investigaciones revelan un incremento de la catalasa.

A.2. NO ENZIMÁTICOS:

Introducción

- *Coenzima Q 10 (Co-Q10)*
- *Melatonina*

Considerada la principal hormona de la glándula pineal, es un derivado químico de la serotonina, cuya producción y secreción máxima tienen lugar durante la noche y cuya misión es entrar en todas las células del organismo para realizar en ellas su función más básica, que consiste en actuar como un potente neutralizador de radicales libres. La melatonina atrapa al radical OH⁻ además de estimular enzimas antioxidativas importantes, por lo que es considerada actualmente como un importante antioxidante (42).

- *Glutación*
- *L-Carnitina*
- *N-Acetil Cisterna*
- *L-Arginina*

B. ANTIOXIDANTES EXOGENOS

Las vitaminas actúan donando o aceptando electrones en las reacciones de óxido-reducción y los minerales regulan la actividad de las enzimas antioxidantes actuando como cofactores.

- *Vitamina E*
- *Vitamina C*
- *Vitamina A*
- *Vitamina B 6*
- *Vitamina B12*
- *Ácido fólico*
- *Betacaroteno*
- *Licopeno*
- *Polifenoles*

C. COFACTORES

Antioxidantes

Los oligoelementos, manganeso, cobre, selenio y zinc actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes, pero también son capaces de ejercer funciones antioxidantes de manera independiente.

- *Selenio*
- *Manganeso*
- *Hierro y cobre*

Tienen importantes propiedades antioxidantes, pero también pueden actuar como importante fuente de producción de radicales libres, ya que en su forma reducida (Fe^{2+} y Cu^{+}) son muy reactivos (a diferencia de la forma oxidada Fe^{3+} y Cu^{2+}), descomponiendo el peróxido de hidrógeno en radical hidróxilo

- *Zinc*

❖ *SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN (16)*

Las estructuras capaces de contrarrestar un estrés oxidativo deben tener una estructura química tal, que les permita no sólo atrapar el radical libre, sino también estabilizarlo en su estructura, ya que de otra manera ellos podrían convertirse en propagadores del proceso oxidativo.

Existen varios tipos de antioxidantes en el organismo que se encuentran en la membrana o citoplasma de la célula. Estos son:

- las enzimas antioxidantes que catalizan reacciones para formar sustancias menos reactivas.
- los antioxidantes preventivos no enzimáticos, que actúan generalmente como secuestrantes de los metales de transición.
- las vitaminas que son recolectoras o detienen la reacción en cadena.
- el alopurinol u oxipurinol, que actúan como inhibidores enzimáticos en algunas de las reacciones donde se forman radicales libres.

A. PRIMARIOS (23)

Previenen la formación de nuevas ERO actuando sobre ellas antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas.

En este grupo destacan las enzimas SOD, GP, CAT y proteínas de unión a metales como la ferritina y la ceruloplasmina.

Pertenecen a este grupo los secuestrantes de los metales de transición, que favorecen la integridad de la membrana hidrofóbica, el citosol hidrofílico y, al mismo tiempo, el compartimiento extracelular. Tienen actividades anti-radicales interviniendo en la fase de iniciación, pero sobre todo en la de propagación, para evitar la acción del OH⁻.

Los metales de transición contenidos en el organismo están ligados, pero cualquiera que escape durante la muerte celular es rápidamente secuestrado para prevenir la actividad redox. Un ejemplo lo constituyen las proteínas ligadoras de hierro transferrina y lactoferrina, y la de cobre ceruloplasmina.

B. SECUNDARIOS

Capturan los RL y evitan las reacciones en cadena. Dentro de éstos hay dos subgrupos:

- Antioxidantes hidrofílicos: entre los que se encuentran la vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentran la vitamina E, carotenoides y las ubiquinonas.

Las vitaminas se encuentran en este grupo de sustancias. Estas reaccionan con los radicales libres antes de producir daño en las estructuras del organismo. En el proceso de recolección, estas moléculas son a su vez oxidadas pudiendo ser regeneradas por la acción de otros antioxidantes.

Antioxidantes

C. TERCIARIOS

Son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100 % de eficiencia. Los antioxidantes no enzimáticos son frecuentemente añadidos a los alimentos para prevenir la peroxidación lipídica que se asocia a numerosas patologías y a estados de estrés oxidativo.

11.4. FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN LOS ALIMENTOS

Además de la protección antioxidante endógena, el organismo obtiene a través de la dieta, moléculas antioxidantes. Los antioxidantes en la dieta se encuentran en la fruta, en los vegetales y en suplementos dietéticos diarios. *The National Academy of Sciences* recomienda 90 mg/día de vitamina C para un hombre adulto y 15 mg/día de vitamina E. Los carotenoides y el selenio se han recomendado dosis diarias de 900 y 55 µg/día respectivamente.

Vitamina E

Las fuentes más importantes son: aceites vegetales, aceites de semillas prensadas en frío, germen de trigo, germen de maíz, almendras, avellanas, girasol, frijol de soya, nuez y maní. Otras fuentes significativas son: patatas crudas, pimentón, aguacate, apio, repollo, frutas, pollo y pescado.

Vitamina C

Frutas como: limón, lima, naranja, marañón, guayaba, mango, kiwi, nance, fresa, papaya, mora y piña. Verduras como: tomate, verduras de hojas verdes (espinacas, perejil, hojas de rábano), repollo, coliflor, brócoli, pimentón y lechuga.

Ácido fólico.

Introducción

En: Hortalizas de hojas verdes y oscuras, guisantes y fríjoles secos (legumbres), frutas y jugos de cítricos, en el hígado de algunos animales, como la ternera, y también en el pescado azul.

Carotenoides

- Betacaroteno: Verduras y frutas amarillas y anaranjado y verduras verde oscuro.
- Alfa-caroteno: Zanahoria.
- Licopeno: Tomate.
- Luteína y zexantina: Verduras de hoja verde oscuro, brócoli.
- Beta criptoxantina: Frutas cítricas.

Selenio

En: carnes, pescado, mariscos, cereales, ajo, champiñones, espárragos y pipas de girasol.

Zinc

En: carne, embutidos, paté, hígado, moluscos, crustáceos, almendras, avellanas, nueces, huevo, leche y derivados lácteos, cereales y legumbres.

Hierro

En: melocotones, albaricoques secos, sésamo, legumbres, cereales, germen de trigo, hígado, ternera, almendras, avellanas, mejillones y almejas.

Magnesio

En: frutos secos, especialmente almendras, avellanas, piñones, cacahuetes, nueces y anacardos en cereales y legumbres.

L-Carnitina

En: la carne, en menor cantidad en la leche y los productos lácteos y en cantidades muy pequeñas en los alimentos vegetales.

Coenzima Q 10

Antioxidantes

En: carne, vísceras, pescado (fundamentalmente azul), sardinas, cacao, aceite de soja y cacahuete.

Glutación

En frutas y verduras.

Cobre

En: cerdo, pato, salmón, carne de órganos como hígado, corazón, riñón, gelatina de carne, nueces, semillas, leche chocolateada, leche de soja y frutos del mar.

11.5. SINERGISMO ENTRE ANTIOXIDANTES

El sinergismo se produce cuando dos o más antioxidantes presentes en un sistema muestran un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus acciones individuales.

En algunas ocasiones el papel del sinergista consiste en regenerar el antioxidante oxidado mediante una reacción redox que cataliza su paso al estado reducido original. Esto es lo que ocurre entre la vitamina C y la vitamina E, cuando la primera regenera a la segunda, así como entre el betacaroteno y la vitamina C.

En cuanto a la potenciación de sus acciones, la literatura recoge ampliamente el efecto sinérgico entre el selenio y la vitamina E.

También se ha mencionado el de las antocianinas (pigmentos antioxidantes de frutas y verduras) con la vitamina C.

11.6. INDICACIONES

- Antecedentes hereditarios de enfermedad aterosclerótica o tumoral.
- Tabaquismo.

- Hipertensión arterial.
- Prevención primaria de dislipidemia, diabetes, obesidad, sedentarismo, estrés y menopausia.
- Prevención secundaria de angina de pecho, afección vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, antecedentes de infarto, técnicas de revascularización previas (*bypass*, angioplastia, terapias trombolíticas), cataratas incipientes, displasias mamarias, trasplante de órganos, cáncer, *infertilidad masculina* y enfermedades neurodegenerativas (26).

11.7. PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES EN DISTINTAS ENFERMEDADES

Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular secundaria al proceso conocido como *arteriosclerosis* constituye la primera causa de mortalidad e invalidez en los países desarrollados. La modificación oxidativa de las lipoproteínas, particularmente las LDL por los RL y la disfunción endotelial, consecuencia de una respuesta inflamatoria y linfoproliferativa crónica que afecta a la íntima arterial, serían los mecanismos básicos de la aterogénesis.

El colesterol y los fosfolípidos de las LDL se encuentran protegidos de la oxidación por varios agentes antioxidantes lipofílicos: vitaminas E, B, C y ubiquinol. El antioxidante más importante en la protección de las lipoproteínas es la vitamina E, calculándose que cada molécula de ésta es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos.

En cuanto a la *hipertensión arterial (HTA)*, se ha comprobado que el anión superóxido puede contrarrestar la acción vasodilatadora del óxido nítrico, por lo que un desequilibrio entre ambas sustancias a favor de la primera favorecería el desarrollo de HTA, al deteriorar la relajación vascular dependiente del endotelio (43).

Antioxidantes

La HTA se asocia con un aumento del estrés oxidativo vascular, pero está en debate si el EO es causa o consecuencia de la HTA.

El EO promueve la proliferación e hipertrofia de las células del músculo liso vascular y el depósito de colágeno, lo que origina el adelgazamiento de la media y la disminución de la luz vascular. Además produce daños en el endotelio impidiendo su relajación y potenciando la contractilidad vascular.

Por otra parte, se ha objetivado que la reducción de la HTA con un tratamiento antihipertensivo, reduce el EO, lo que apuntaría a que éste es más una consecuencia de la HTA, pero que a su vez tendería a perpetuarla. Estudios recientes sugieren que una disminución en la producción de melatonina guarda relación con la aparición de patología cardiovascular, incluida HTA y cardiopatía isquémica.

El mecanismo aún no está claro, pero parece que la activación de receptores de melatonina en el endotelio y en las células del músculo liso, y sus propiedades como antioxidante serían responsables de sus efectos en el tono vascular (44).

En la *insuficiencia cardiaca congestiva (ICC)*, existe un aumento de prostaglandinas, cuya formación genera RL. Además se producen grandes cantidades de óxido nítrico que condiciona una vasodilatación irreversible.

En la insuficiencia cardiaca tanto la vitamina E como la coenzima Q10 han obtenido algunos resultados clínicos favorables y una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en plasma.

Hipercolesterolemia. La suplementación de 100 mg/día de vitamina E, ha permitido disminuir los niveles de LDL tanto en hombres como en mujeres sanos, sin embargo no ha demostrado ningún beneficio en personas con cardiopatía isquémica conocida.

Cáncer

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren una correlación inversa entre la ingesta de antioxidantes y el riesgo de adquirir diversos tipos de tumores, y tienden a señalar al betacaroteno como el agente protector en enfermedades tumorales. Como posible mecanismo, se reconoce que el ADN puede dañarse y sufrir mutaciones por lesión directa de los RL sobre las bases, o de forma indirecta, afectando la actividad de las proteínas específicas que lo repara (proto-oncogen), o lo frena (supresores). También diversos metales actúan como prooxidantes provocando lesiones en el ADN al generar radicales libres, tal es el caso del hierro, cobre y cromo en su forma reducida.

Se ha demostrado que la vitamina E, induce la muerte celular en células del cáncer colorrectal y aumenta la inhibición del crecimiento de éstas células por el 5-fluorouracilo, lo que podría hacerla útil como tratamiento complementario para este tipo de cáncer. Sin embargo, el Instituto Americano para la Investigación sobre el Cáncer concluye que no hay evidencias suficientes para justificar su empleo habitual en los pacientes que reciben quimioterapia o radioterapia.

Enfermedades oculares

La directa exposición del ojo a las radiaciones ionizantes, el humo del tabaco y otros agentes generadores de RL, determina que algunas estructuras se afecten por el EO. Una dieta rica en betacarotenos, vitaminas C y E, y zinc, se asocia con una disminución de la progresión y del riesgo de padecer la *degeneración macular asociada a la edad*, principal causa de ceguera bilateral en países desarrollados. Se ha descrito que, los individuos con altas concentraciones plasmáticas de por lo menos dos de los tres antioxidantes antes mencionados (vitaminas E, C, betacaroteno), presentaban un riesgo menor de adquirir *cataratas* que los individuos con valores bajos (45).

Enfermedades del sistema inmune

Se ha observado que las funciones del sistema inmune más relacionadas con el EO, tales como la adherencia y la producción de radicales libres y de citoquinas proinflamatorias, son las que aumentan con la edad, por lo que hay quien define el envejecimiento como un proceso inflamatorio crónico. Con la

edad y en estados oxidativos disminuyen los linfocitos B, T, las células natural killer y ciertas linfoquinas. Estos efectos pueden ser en parte compensados por una cantidad adecuada de antioxidantes. En situaciones de inflamación crónica, ésta es la situación que tiene lugar habitualmente, por lo que la función linfocitaria está comprometida, pero puede ser parcialmente revertida por la acción de la catalasa y otros antioxidantes (46).

Hepatopatía alcohólica

En su progresión de esteatosis a cirrosis, la vitamina E tiene un importante papel al reducir el estrés oxidativo y por tanto la peroxidación lipídica. Investigadores de la Unidad Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Reina Sofía, de Córdoba, han confirmado que la vitamina E, disminuye los niveles de necrosis y apoptosis celular en cultivos primarios de hepatocitos humanos, lo que podría servir en un futuro para revertir las lesiones hepáticas agudas por tóxicos.

Enfermedades del sistema nervioso central

El EO afecta de forma especial al sistema nervioso central, donde hay una elevada concentración de lípidos poliinsaturados y una baja concentración de antioxidantes enzimáticos. En los últimos años se han presentado numerosos datos que parecen sugerir un posible papel del EO en la patogenia de la *Enfermedad de Alzheimer*.

Estos incluyen la demostración de un aumento de los procesos oxidativos de lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico, alteraciones en las concentraciones de algunos factores prooxidantes y antioxidantes en el cerebro y en otros tejidos, alteraciones de la función mitocondrial y del papel del amiloide y su proteína precursora en los procesos oxidativos en modelos experimentales (cultivos de neuronas corticales y animales transgénicos).

Los antioxidantes podrían proteger contra la enfermedad de Alzheimer al limitar la acumulación de la proteína tóxica amiloide.

Hasta ahora, la evidencia sugiere que las dietas altas en alimentos que contienen vitaminas antioxidantes como E, C, y betacaroteno, podrían reducir

el riesgo de enfermedad de Alzheimer y la velocidad de progresión de la enfermedad, pero aún faltan argumentos para recomendar el aporte suplementario de dichas vitaminas.

Infertilidad masculina

Son crecientes las evidencias que señalan al estrés oxidativo como un factor determinante en la patogenia de la infertilidad masculina, pues la mayoría de estos pacientes presenta altas concentraciones de ERO y/o una disminución de la capacidad antioxidante del semen (algunos trabajos evidencian una disminución de la SOD).

De hecho, los niveles de RL producidos por los espermatozoides dañados o defectuosos son superiores a los generados por aquellos morfológicamente normales, y en pacientes con oligozoospermia se encuentran valores elevados del anión superóxido.

Además, los leucocitos que infiltran el semen de varones estériles, principalmente los neutrófilos, mediante la producción de interleucina 8, aumentan la síntesis de ERO y favorecen así el estrés oxidativo. Esta situación da lugar a la peroxidación lipídica de la membrana del espermatozoide y la alteración de su ADN mitocondrial y nuclear.

Los lipoperóxidos resultantes y sus productos de degradación son altamente tóxicos para los espermatozoides y provocan un daño irreversible en su motilidad. Además, varias observaciones sugieren la existencia de una asociación negativa entre la capacidad de fusión espermatozoide-óvulo y los niveles de ERO (47).

11.8. POBLACIÓN DIANA DE LOS ANTIOXIDANTES

Ciertas condiciones físicas como ser fumador, el exceso de estrés, el ejercicio físico intenso, la exposición solar y la infertilidad masculina, se han relacionado con la aparición de estrés oxidativo y sus consecuencias.

Las terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas en antioxidantes, parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por el estrés oxidativo.

Pese a existir varios estudios con resultados positivos, también existen otros en los que la intervención a base de antioxidantes no ha resultado eficaz. Estos resultados no concluyentes o contradictorios se pueden deber a múltiples causas, entre ellas el diseño del estudio.

La eficacia de las terapias antioxidantes dependerá, en última instancia, de definir qué situaciones son las propicias para que estos tratamientos sean exitosos.

A continuación se detallan algunos casos concretos:

Exposición solar

La Radiación Ultravioleta de la luz solar o de lámparas de luz artificial aumenta la producción de RL generando por tanto estrés oxidativo, que puede propiciar quemaduras, envejecimiento celular, supresión o daño al sistema inmune cutáneo y cáncer de piel.

Según investigaciones algunos antioxidantes orales podrían reducir la aparición de líneas finas y arrugas, mejorar el aspecto de la piel, y proporcionar mayor protección contra el daño solar al combinarse con protectores tópicos. En este sentido las vitaminas C y E y el selenio, ayudan a proteger la piel contra el daño solar y el cáncer de la piel, y podrían revertir parcialmente arrugas y la decoloración asociada con el envejecimiento y la exposición solar (48).

Estrés

El estrés agota los nutrientes del cuerpo, en particular, la vitamina C, el complejo B y el zinc. La vitamina B6 y B5 son importantes en situaciones de estrés. Las vitaminas C, E y el zinc, favorecen el proceso de recuperación.

Ejercicio físico

En el ejercicio físico, el elevado consumo de oxígeno (principalmente por el músculo esquelético), el aumento de catecolaminas y lactato en plasma, el aumento de la temperatura corporal y la activación de los neutrófilos aumentan la producción de RL.

El entrenamiento potencia y estimula la actividad de los sistemas antioxidantes, pero cuando el ejercicio es prolongado y/o extenuante, la producción de RL supera la capacidad antioxidante corporal, generándose estrés oxidativo. Algunos trabajos sugieren que el ejercicio disminuye los niveles de vitamina E en los tejidos y provoca un cambio en el estado del glutatión reducido, por lo que se ha postulado que la suplementación con antioxidantes, fundamentalmente vitamina C, vitamina E, betacaroteno y selenio, podrían mejorar el rendimiento y prevenir la fatiga muscular, ya que se ha visto que reduce los marcadores indirectos de peroxidación lipídica tales como el MDA (49).

Tabaco

El humo de tabaco, fuente de oxidantes y radicales libres, genera estrés oxidativo, que interviene en la fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Estos oxidantes están implicados en el reclutamiento de las células inflamatorias pulmonares y en el secuestro pulmonar de los neutrófilos. A su vez, las mismas células pulmonares, cuando son estimuladas, liberan gran cantidad de oxidantes (50).

Algunos estudios han concluido que los pacientes con EPOC, presentan niveles de vitaminas antioxidantes muy por debajo de los rangos antioxidantes, incluso por debajo de las medias encontradas en otras poblaciones sanas.

Así mismo señalan que su nivel de estrés oxidativo es inversamente proporcional a su concentración de vitaminas E y C. Queda por demostrar si la administración exógena de estas vitaminas, en dosis suficientes para alcanzar concentraciones séricas en rangos antioxidantes, disminuirían los niveles de peroxidación lipídica, y si esto detendría claramente la progresión de la enfermedad.

Algunos trabajos apuntan que la vitamina C destruye eficazmente las nitrosaminas, por lo que se le atribuye un efecto anticarcinógeno frente al humo del tabaco por concentrarse en los alvéolos pulmonares, así como de inhibición de la invasión tumoral (51).

Parece que el tratamiento antioxidante con vitamina C, E, betacaroteno y selenio, bien suplementados en la dieta o como complejos vitamínicos, se ha relacionado en algunos trabajos con una mejoría en los parámetros de función pulmonar y con una disminución de los síntomas en pacientes con EPOC.

En cuanto a los antioxidantes de síntesis, la molécula más conocida es la EPOC N-acetilcisteína (NAC), utilizada inicialmente como mucolítico cuando no era tan conocido su papel antioxidante, basado fundamentalmente en aumentar la síntesis de glutatión. En humanos se ha observado que la administración oral de NAC incrementa los valores de glutatión en el lavado bronquiolo-alveolar, suprime la exhalación de H₂O₂ y reduce el número de infecciones virales y colonizaciones bacterianas.

11.9. ANTIOXIDANTES EN EL VARÓN SUBFÉRIL

Zini y cols (52), urólogos en Montreal, se proponen como objetivo de su artículo, discutir la racionalidad de la terapia antioxidante en el varón estéril. De hecho, titulan su artículo preguntándose si, *¿la terapia antioxidante es una realidad o una ficción?*

Hasta la fecha actual, muchos estudios clínicos sugieren que los suplementos antioxidantes son beneficiosos para mejorar la función espermática y la integridad del DNA. Sin embargo, el mecanismo de acción exacto de los antioxidantes orales y su dosis adecuada, no ha sido establecido.

La racionalidad para tratar al varón estéril con antioxidantes, se basa en la premisa de que el estrés oxidativo seminal (muy frecuente en el varón estéril) se debe, en parte, a una deficiencia en antioxidantes seminales. La facilidad para prescribir antioxidantes orales también se fundamenta en los pocos

efectos adversos descritos, aunque escasos estudios han evaluado cuidadosamente el riesgo del exceso de tratamiento con antioxidantes (53).

De modo ideal, un antioxidante oral debe alcanzar altas concentraciones en el sistema reproductor y completar la deficiencia en elementos vitales que son necesarios para la espermatogénesis. Por otra parte, el suplemento antioxidante debe aumentar su capacidad de acción en el plasma seminal y reducir los niveles de ROS en semen (52).

Sin embargo, las concentraciones de ROS en semen no deben ser suprimidas completamente por los antioxidantes orales, ya que esto condicionaría una alteración en las funciones espermáticas normales, como la capacitación espermática y su hiperactivación, que precisan de unas cantidades mínimas pero necesarias de ROS (54).

Hasta hoy, mas de 150 trabajos clínicos y experimentales han evaluado el efecto de los antioxidantes sobre los parámetros seminales, pero a pesar de esta enorme producción científica, *no nos resulta posible establecer firmes conclusiones respecto a si los antioxidantes son beneficiosos para tratar al varón estéril, porque los estudios son: muy heterogéneos, no controlados, las muestras pequeñas, no comparativos, y apenas se ha valorado como éxito primario de esta terapia, la tasa de embarazo, y que decir de la tasa de embarazo clínico o de nacido vivo (8).*

Además, el posible mecanismo de acción de los antioxidantes orales en el tratamiento de la esterilidad del varón (supresión del estrés oxidativo seminal) no han sido totalmente confirmado en los escasos estudios realizados en este sentido.

Tampoco existen estudios que confirmen las dosis óptimas, la duración del tratamiento, la población de varones que pueden beneficiarse más de esta terapia (astenospermia aislada, oligoastenospermia, teratospermia, o fragmentación del DNA).

Los antioxidantes que mas se han estudiado para mejorar la infertilidad masculina del varón subfétil han sido :

1. Glutación

Es una proteína formada por tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico. Sintetizado intracelularmente, su concentración varía de acuerdo con el contenido de aminoácidos sulfúricos en la dieta. Es sustrato para la GSH, aunque la limitada permeabilidad de la membrana al glutati3n puede reducir la efectividad de este mecanismo.

Adem3s, el glutati3n puede atrapar por s3 solo el oxigeno libre, O₂ - y OH⁻, y reaccionar directamente con aldeh3dos citot3xicos producidos durante la peroxidaci3n lip3dica, tales como el 4, hydroxynenol. As3 protegen los grupos tiol sobre la membrana plasm3tica. Adem3s, esta mol3cula facilita la acci3n antioxidante del tocoferol en la membrana plasm3tica del espermatozoide, participando en la regeneraci3n de los radicales tocoferol y dehidroascorbato.

Es uno de los antioxidantes mas comunes que se encuentran en el cuerpo. Tiene un papel importante protegiendo a los l3pidos, a las prote3nas y a los 3cidos nucleicos del da3o oxidativo. Se combina con la vitamina E y el selenio para formar glutati3n peroxidasa (GSH), principal enzima implicada en la eliminaci3n de peroxido de hidrogeno en el epid3dimo. Se han encontrado concentraciones fisiol3gicas significativas en plasma seminal, y a pesar de no atravesar membranas, la concentraci3n puede aumentar en fluidos biol3gicos en administraci3n parenteral.

El consumo de glutati3n a dosis mayores a 600 mg/dl, incrementa la motilidad del espermatozoide, fundamentalmente la movilidad progresiva (55).

La deficiencia de glutati3n puede dar inestabilidad a la pieza intermedia resultando defectuosas tanto la morfolog3a como la motilidad.

2. Polifenoles

Son un conjunto heterog3neo de mol3culas que comparten la caracter3stica de poseer en su estructura varios grupos fen3licos y de tener potente actividad

antioxidante. Los polifenoles del vino incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos, quercetina, catequinas y resveratrol. La presencia de alcohol puede aumentar la absorción de los polifenoles del vino al aumentar su solubilidad.

El vino sigue siendo considerado un componente con potencial antioxidante. También son de gran importancia los polifenoles presentes en infusiones y extractos naturales, destacando las catequizas presentes en el té verde. En el aceite de oliva, fundamentalmente en el de oliva virgen, están presentes, sobre todo, los fenoles simples hidrotirosol y tirosol. Además contiene ácidos grasos monoinsaturados, que son más resistentes a la oxidación que los poliinsaturados. Por todo ello el vino y el aceite de oliva son considerados componentes con función antioxidante.

Los flavonoides son un gran grupo de antioxidantes polifenólicos que se encuentran naturalmente en frutas y vegetales. Los más importantes son las antocianinas, flavones y flavonoles. Son compuestos solubles en agua y captadores de oxígeno libre y de los radicales superóxido, peroxilo y peroxilipídicos.

3. Metales pesados

Ingerir adecuados niveles de zinc y cobre, se necesita para mantener el óptimo nivel funcional de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa. La dosis diaria ingerida en USA es de 12.3 mg de zinc y de 900 mg de cobre por persona (41). El zinc y el cobre, son metales pesados que constituyen una parte de la enzima antioxidante SOD.

Dosis adecuadas de estos elementos son importantes para mantener la función de esas enzimas. A pesar de que ambos metales son importantes constituyentes de enzimas antioxidantes, altas concentraciones de estos metales pueden catalizar reacciones que incrementen los ROS.

Sulfato de zinc

Antioxidantes

Se le llama un “elemento traza esencial” porque son necesarias muy pequeñas cantidades de zinc para la salud de los seres humanos. El cuerpo contiene 1.5-2.5 gr de zinc. Se encuentra prácticamente en la totalidad de las células, pero existe con mayor abundancia en determinados tejidos animales. El músculo esquelético y el hueso combinados contienen el 90% del zinc total del organismo.

En el músculo, el encéfalo, los pulmones y el corazón, las concentraciones son relativamente estables y no responden a las variaciones del contenido del metal en la dieta. En otros tejidos como el hueso, los testículos, el pelo y la sangre, la concentración tiende a reflejar la ingesta dietética del mismo.

Es muy abundante en las carnes rojas, en algunos mariscos, en el germen de los cereales y en la leche. Las ostras son consideradas como las mejores fuentes. En los países subdesarrollados, el mineral es provisto fundamentalmente por cereales y legumbres. El zinc contenido en los vegetales suele estar menos biodisponible que el aportado por la mayoría de las proteínas o sales de zinc de origen animal.

La ubicua distribución del zinc en las células, junto al hecho de que es el oligoelemento intracelular más abundante, indica que sus funciones son muy básicas (56). Funciones :

A) Las *funciones catalíticas* son ejercidas por metaloenzimas. Son enzimas que requieren del zinc para su actividad metabólica. Se considera que una enzima es una metaloenzima con zinc cuando la eliminación de zinc causa una reducción de la actividad sin afectar a la irreversibilidad de la proteína enzimática y cuando la reconstrucción con zinc restablece su actividad.

B) El zinc desempeña *funciones estructurales* mediadas por la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y en la división celular. Las nucleoproteínas lo contienen en mucha cantidad y estas probablemente estén involucradas en la expresión genética de varias proteínas de función reguladora.

Se plantea el uso del zinc como un antioxidante y que además puede estabilizar las membranas celulares al igual que la vitamina E. Interviene en la regulación del estrés oxidativo.

Las NADPH oxidasas son un grupo de enzimas asociadas a la membrana plasmática que catalizan la producción de superóxido mediante el empleo de NADPH como electrón donante. El zinc es un inhibidor de esta enzima. La enzima superóxido dismutasa 1 y 3 contiene cobre y zinc.

Se sabe que el zinc induce la producción de metalotioneína, que es muy rica en cisteína y es un excelente atrapador de radicales hidróxilo. Los iones de hierro y cobre catalizan la producción de iones hidróxilo a partir del peróxido de hidrógeno. El zinc, al competir tanto con el hierro como con el cobre por la fijación a la membrana celular disminuye la producción de dichos radicales.

Su efecto en la infertilidad masculina:

El semen es particularmente rico en zinc, siendo un factor clave en la función de la glándula prostática y en el crecimiento del órgano reproductivo en el varón. Tiene un papel destacado en la fertilidad masculina, está implicado en la síntesis de testosterona, en la mejora del recuento, de la movilidad y de la morfología de los espermatozoides. Una deficiencia de zinc puede causar un perjuicio en la espermatogénesis.

La deficiencia de zinc se asocia con un flagelo anormal lo que se muestra con una vaina fibrosa hipertrófica e hiperplásica, la interrupción del axonema y parte de los defectos de los brazos de dinena de los dobletes de los microtúbulos, así como con la estructura del axonema deformada en su interior y mala formación o ausencia de la pieza intermedia.

Estudios recientes relacionan una ingesta inadecuada de zinc con una disminución de las defensas antioxidantes y de los mecanismos de reparación del ADN provocando que las células espermáticas sean más susceptibles al daño oxidativo.

Se ha observado que las concentraciones de zinc en el plasma seminal son más bajas en el varón con infertilidad idiopática en comparación con los controles fértiles. Por lo que se relaciona una baja concentración de zinc en el plasma seminal con la infertilidad idiopática y una menor calidad del espermatozoide.

Actúa como un eliminador de ROS, regulando la motilidad espermática. En hombres con astenospermia, la ingesta de sulfato de zinc (500mg durante 3 meses) mejora la calidad espermática (recuento, motilidad progresiva y capacidad de fertilización) y reduce la incidencia de Ac antiespermatozoides (33).

Estudios prospectivos muestran una mejora en la concentración espermática, en la motilidad progresiva (57), en la integridad espermática y en las tasas de embarazo en hombres infértiles después de la suplementación con zinc.

Un ensayo controlado, randomizado, y doble ciego, parece asegurar que la suplementación conjunta de zinc y folato hace que actúen sinérgicamente para mejorar la calidad del semen (58).

Ross en 2010 (57) publicó un metaanálisis para evaluar el efecto del sulfato de zinc como antioxidante en la infertilidad masculina y concluyó que:

- Solamente ha sido estudiado como antioxidante único en 3 estudios (58,59,60). La motilidad mejoró en 2 estudios (59,60), la concentración mejoró en dos estudios (58, 59), pero la morfología no mejoró en ninguno de los 3 estudios donde fue evaluado (59).
- Ha sido utilizado en combinación con otros antioxidantes en 4 estudios (61, 60, 58, 62). La motilidad mejoró en uno de los 3 estudios (60), la concentración mejoró en 2 de los 3 estudios (58, 61), pero la morfología no mejoró en ninguno de los 3 estudios. La tasa de embarazo mejoró en uno de los 2 estudios (62).

4. Vitamina E

El termino Vitamina E es un descriptor genérico para dos familias: los tocoferoles y tocotrienoles (α , β , γ , y δ). Sin embargo, a veces se identifica a uno de los isómeros el α -tocoferol como vitamina E. Es liposoluble y actúa principalmente en el interior de las membranas celulares.

Se considera el protector más importante de las moléculas lipídicas, ya que su acción consiste en proteger de la peroxidación a los ácidos grasos poli-insaturados de los fosfolípidos de la membrana celular y también en inhibir la peroxidación de las LDL. Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidróxilos, neutraliza peróxidos y captura el anión superóxido para convertirlo en formas menos reactivas.

Se ha propuesto que además de su función antioxidante puede desempeñar una función fisicoquímica específica en el ordenamiento de las membranas lipídicas, especialmente de los fosfolípidos ricos en ácido araquidónico, actuando como estabilizador de membranas.

Los requerimientos diarios de vitamina E (α -tocoferol) varia de 50 a 800 mg, dependiendo de la toma de fruta, vegetales, te o vino (National Academy of Sciences, 1989).

Su efecto en la infertilidad masculina

Es el mejor antioxidante demostrado a nivel de membrana de los espermatozoides. Se encarga de neutralizar tres tipos de radicales libres: superóxido, peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo. Se recomienda una dosis diaria de 600mg , la cual disminuye los niveles de MDA incrementando la motilidad espermática. En estudios *in vitro* incrementa la capacidad de penetración del espermatozoide al óvulo y el recuento espermático.

El efecto combinado de vitaminas lipofílicas e hidrofílicas aunque inefectivo *in vitro*, parecen actuar sinérgicamente *in vivo* para reducir el ataque peroxidativo sobre el espermatozoide.

Resultados de experimentos *in vitro* sugieren que la vitamina E puede proteger al espermatozoide del estrés oxidativo así como de la pérdida de motilidad (54). Estudios recientes controlados y randomizados han mostrado que la vitamina E puede ser efectiva en el tratamiento de hombres infértiles con altos niveles de ROS (63,64,57).

El tratamiento con vitamina E disminuye las concentraciones de MDA en los espermatozoides hacia niveles similares a los encontrados en normozoospermicos, mejorando la motilidad y así como la probabilidad de embarazo (64). La Vitamina E puede también ser añadida como crioprotector para proteger al espermatozoide del incremento de su exposición al EO durante la criopreservación y procesos descongelantes, los cuales reducen la motilidad espermática (65).

Ross, en 2010 (57), realizó un metaanálisis para evaluar el efecto de la vitamina E como antioxidante en la infertilidad masculina y observó:

- Que solo fue estudiada como antioxidante único en un estudio (64) a una dosis diaria de 300 mg durante 26 semanas. Este estudio mostró mejoras tanto en a motilidad espermática como en la tasa de embarazo.
- La vitamina E ha sido utilizada conjuntamente con otros antioxidantes en 7 estudios (61,66,67,60,68,69,62). La motilidad espermática mejoró en 3 de los 6 estudios (67,60,69), la concentración espermática mejoró en uno de los 6 estudios (61) y la fragmentación del ADN en dos de dos estudios (60,66). La morfología espermática no mostro mejoría en ninguno de los 5 estudios donde fue evaluado este parámetro (61,66,67,69,68). La tasa de embarazo fue mayor solo en uno de los 4 estudios donde fue evaluado (62).

5. Vitamina C

Una gran mayoría de animales y plantas son capaces de sintetizar vitamina C, a través de una secuencia de pasos enzimáticos a través de los cuales

convierten la glucosa en vitamina C. Los seres humanos no poseen la capacidad enzimática de producir vitamina C.

La causa de este fenómeno es que la enzima del proceso de síntesis, la L-gulonolactona oxidasa, está ausente debido a que el gen para esta enzima (Pseudogene ΨGULO) es defectuoso.

La vitamina C puede absorberse como ácido ascórbico y como ácido dehidroascórbico a nivel de mucosa bucal, estómago y yeyuno, y luego es transportada vía vena porta hacia el hígado para luego ser conducida a los tejidos que la requieran. Se excreta por vía renal, bajo la forma de ácido oxálico principalmente, por heces se elimina sólo la vitamina no absorbida.

La vitamina C actúa como antioxidante y agente reductor. Interviene proporcionando electrones a compuestos tanto en el interior de la célula como en el exterior. Así, puede actuar fuera de la célula, conjuntamente con la vitamina E, en la prevención de la oxidación lipídica.

Sus principales funciones son neutralizar el oxígeno singlete, capturar radicales hidróxilos y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada de vitamina E una vez que ha reaccionado con un RL. Actúa de forma sinérgica con la vitamina E, y se ha comprobado que se absorbe mejor si se encuentra en una formulación que contenga vitamina E (70).

Interviene en el mantenimiento de huesos, dientes y vasos sanguíneos por ser buena para la formación y mantenimiento del colágeno. Protege de la oxidación a la vitamina A y vitamina E, como así también a algunos compuestos del complejo B (tiamina, riboflavina, ácido fólico y ácido pantoténico).

Desarrolla acciones anti-infecciosas y antitóxicas y ayuda a la absorción del hierro no hémico en el organismo.

Efecto en la infertilidad masculina

Antioxidantes

El ácido ascórbico es un eliminador hidrosoluble de ROS con alta potencia. Neutraliza a los hidroxilos, superóxido y al peróxido de hidrógeno. Se ha demostrado que previene la aglutinación de espermatozoides así como la lipoperoxidación de las membranas tanto de los ovocitos como del espermatozoide.

Es el mayor antioxidante presente en el fluido extracelular, y se presenta en altas concentraciones en plasma seminal comparado con plasma sanguíneo (364 vs 40 μ M).

Se ha visto reducida la concentración de vitamina C en el plasma seminal de hombres infértiles con altos niveles de ROS. Las concentraciones de ácido ascórbico en plasma seminal se correlacionan positivamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y se ha sugerido a la vitamina C como protectora en el epidídimo. Se ha demostrado que el ácido ascórbico protege a los espermatozoides humano de daño oxidativo endógeno (68).

Cuando la vitamina C se administra en la dieta, incrementa directamente su nivel en el plasma seminal. Se relaciona directamente con la calidad del espermatozoide, por lo cual se prescribe como suplemento alimentario de 250-1000 mg al día. En hombres con astenozoospermia se ha comprobado una disminución significativa de la concentración de ácido ascórbico en el semen (28).

La suplementación con vitamina C puede minimizar el daño oxidativo endógeno del ADN, disminuyendo el riesgo de defectos genéticos, particularmente en población con bajos niveles de vitamina C como fumadores (41). Su reducción a 5 mg/día, está involucrada con el desarrollo de infertilidad, ya que incrementa el daño al ADN de los espermatozoides (55).

Ross, en 2010 (57) realizó un metaanálisis para evaluar el efecto de la vitamina C como antioxidante en la infertilidad masculina y observó:

- La vitamina C no ha sido evaluada como antioxidante único en ninguno de 17 estudios incluidos en esta revisión, por lo tanto, la efectividad como antioxidante único en hombres infértiles se desconoce.

- La vitamina C ha sido utilizada en combinación con otros antioxidantes en 6 estudios (61,66,68,69,62,60). La motilidad espermática mejoró en 2 de los 5 estudios (60,69), la concentración espermática en 1 de los 5 estudios (61) y la fragmentación del ADN espermático en 2 de 2 estudios (60,66). La morfología espermática no mejoró en ninguno de los 5 estudios. La tasa de embarazo después de la ICSI fue mejorada significativamente en el grupo de tratamiento en uno de los estudios (62).

6. Ácido fólico o vitamina B9

El ácido fólico, conocida también como vitamina B9, es una vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B, necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina.

Este ácido se forma en el intestino a partir de nuestra flora intestinal. Se absorbe principalmente en el yeyuno, se distribuye en los tejidos a través de la circulación sanguínea y se almacena en el hígado. Se excreta por orina y heces.

Esta vitamina es fundamental para llevar a cabo todas las funciones de nuestro organismo. Su gran importancia radica en que el ácido fólico es esencial a nivel celular para sintetizar ADN, que transmite los caracteres genéticos, y para sintetizar también ARN, necesario para formar las proteínas y tejido del cuerpo y otros procesos celulares. En los hombres contribuye a la espermatogénesis.

Los niveles de ácido fólico en plasma seminal son mayores que en sangre y en hombres fértiles, si se compara con infértiles (33).

Ross, en 2010 (57) realizó un metaanálisis para evaluar el efecto del ácido fólico como antioxidantes en la infertilidad masculina y observó:

- Que su uso como antioxidante único solo ha sido estudiado como tal en un estudio (58), a una dosis diaria de 5 mg durante 26 semanas, observando mejoras en la concentración espermática pero no en la motilidad ni en la morfología.

- El ácido fólico ha sido utilizado en combinación con otros antioxidantes en 2 estudios (62,58). En el estudio de Wong et al. (58) se encontró mejora solamente en la concentración pero no en la motilidad ni en la morfología y la tasa de embarazo después de un TRA mejoró significativamente en el estudio de Tremellen et al (62).

7. Carnitinas (L-Carnitina y L- Acetil Carnitina)

Es un componente vital en el metabolismo de los lípidos. Su función fundamental es la generación de energía por la célula, pues participa en las reacciones de transferencia de ácidos grasos libres de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial bajo la forma de acil-carnitina, facilitando su oxidación y generación del ATP (adenosin trifosfato).

Para su síntesis se precisa de un aporte de aminoácidos esenciales procedentes de la dieta, principalmente lisina y metionina, además de ácido ascórbico, niacina, piridoxina y hierro. Posteriormente, la L-carnitina se almacena en el retículo sarcoplásmico de las células de músculo esquelético, corazón, cerebro y semen. Aproximadamente el 75% de las reservas corporales de L-carnitina derivan de la dieta, y solamente el 25% se sintetiza *de novo* a partir de lisina y metionina (71).

La administración de carnitina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades:

- Enfermedades cardiovasculares.
- Angina de pecho, infarto agudo de miocardio, necrosis de miocardio, arritmias inducidas por el consumo de drogas, trastornos cardíacos.
- Síndrome de fatiga crónica.
- Concentraciones elevadas de colesterol asociado a LDL.
- Concentraciones elevadas de triacilglicérols.
- Bajo rendimiento físico.
- Enfermedad de Alzheimer, depresión senil y falta de memoria relacionada con la edad.

- Enfermedades renales, trastornos hepáticos, cirrosis hepática.
- Diabetes.
- Bajo recuento y movilidad reducida de los espermatozoides.
- También se utiliza como un «quemador de grasa».

Efecto en la infertilidad masculina

La carnitina, a través de la sangre, llega a las células de los túbulos epididimales y por transporte activo alcanza la luz del epidídimo. El espermatozoide almacena la carnitina tanto de forma libre (L-Carnitina) como acetilada, la L-Acetil-carnitina.

Los niveles más altos de carnitina se encuentran en el epidídimo. La concentración de L-carnitina libre en sangre es de 10-50 $\mu\text{mol/L}$ y en la mayoría de los tejidos la concentración es de 20-50 veces más alta que en sangre.

Las concentraciones en epidídimo son 2.000 veces mayores que en sangre. En la cabeza del epidídimo, la concentración libre de L-carnitina o acetil L-carnitina es muy baja o indetectable, porque las concentraciones aumentan conforme se desciende hacia la cola epididimaria, proceso por el cual el espermatozoide va adquiriendo la motilidad (72, 41).

La función principal de la L-carnitina en el epidídimo es proporcionar un sustrato energético a los espermatozoides, actuando como cofactor en el transporte de ácidos grasos libres de cadena larga dentro de las mitocondrias y su posterior oxidación para la obtención de energía. Niveles bajos de L-carnitina, reducen las concentraciones de ácidos grasos dentro de las mitocondrias, que conduce a una disminución de la producción de energía y a alteraciones potenciales en la movilidad de los espermatozoides en humanos.

La adición de acetil-carnitina y carnitina en el semen eyaculado en humanos, mejora la motilidad in vitro de los espermatozoides. Un mayor ratio acetil-carnitina: carnitina, incrementó la motilidad espermática en espermatozoides con baja motilidad.

El contenido de L-carnitina en el plasma seminal se correlaciona con el recuento y con la motilidad espermática. Se ha observado una reducción del ratio acetil-carnitina:carnitina en espermatozoides con baja motilidad.

Se han encontrado bajas concentraciones de carnitina y de acetil-carnitina en el semen de hombres infértiles comparados con los fértiles.

Estudios clínicos han observado un aumento en la motilidad espermática y en ocasiones en el recuento, en pacientes tratados con carnitina oral (72,41).

La L-carnitina disminuye los ROS al eliminar el acetil-CoA extracelular tóxico responsable de las ROS mitocondriales. La L-carnitina tiene características antioxidantes sobre el líquido seminal, protegiendo del estrés oxidativo a las membranas de los espermatozoides y por lo tanto, no dañando la movilidad de los espermatozoides y la capacidad de los mismos de penetrar hacia la membrana de los ovocitos (71).

En estudios realizados en humanos, se ha observado que la L-carnitina juega un papel fundamental en la fertilidad masculina, aportando energía celular a los espermatozoides, facilitando su movilidad, interviniendo en la formación de su membrana, en la maduración espermática y aumentando la calidad del semen (71). La carnitina protege el ADN espermático y las membranas celulares del daño inducido por los ROS y la apoptosis (41).

Ross, en 2010 (57) realizó un metaanálisis para evaluar el efecto de la L-Carnitina como antioxidante en la infertilidad masculina y observó que:

La L-Carnitina y la acetil L-carnitina han sido utilizadas como único antioxidante en 4 estudios (73,74,75,72). La motilidad espermática mejoró en 3 de los 4 estudios (73,74,75), la concentración mejoró en 1 de los 4 estudios (74) y la morfología mejoró en uno de los 3 estudios (74). La tasa de embarazo mejoró en dos de los 3 estudios (74,75).

Diferentes estudios han observado que el tratamiento con L-carnitina en cantidades diarias de 2-4 g es útil para reducir la infertilidad masculina, especialmente idiopática.

La suplementación de L-carnitina puede considerarse de carácter preventivo y terapéutico, actuando como un buen complemento para mejorar técnicas como la inyección intracitoplasmática o tratamientos de reproducción asistida.

Los estudios presentados sugieren un creciente interés del uso de la L-carnitina como un agente terapéutico en la infertilidad masculina.

A pesar del número de estudios ya realizado, la ausencia de efectos adversos, y la biodisponibilidad satisfactoria, se necesitan más estudios clínicos con humanos en cohortes grandes y con el máximo de variables controladas, para demostrar toda la eficacia, la seguridad y la dosis ideal de la suplementación de la L-carnitina para mejorar los parámetros seminales y los resultados de embarazo en tratamientos para la infertilidad masculina, pues aún existen divergencias entre resultados.

8. Selenio

El selenio de los alimentos proviene del suelo, el agua es generalmente de poca importancia en el suministro del mismo. En el organismo se almacena en el hígado, páncreas, riñón, testículos y vesículas seminales. El cuerpo humano contiene alrededor de 20 gr de selenio.

Algunas de las *funciones* más importantes que el selenio realiza en el organismo son:

- Anticancerígeno y antienvjecimiento
- Ayuda a proteger el organismo después de una vacuna
- Es un antídoto contra el envenenamiento causado por materiales pesados como el mercurio, cadmio, arsénico, oro, plata y cobre
- Incrementa la eficacia de la vitamina E

Antioxidantes

- Actúa como un antioxidante al ayudar al organismo a producir proteínas especiales que evitan el daño celular
- Tiene propiedades antidepresivas
- Previene el cáncer
- Estimula el crecimiento
- Mejora la elasticidad de los tejidos
- Favorece la formación de anticuerpos
- Previene y trata la aparición de caspa
- Actúa como un antiinflamatorio
- Ayuda a proteger el organismo de enfermedades cardiovasculares
- Ayuda a disminuir los sofocos propios de la menopausia
- *Incrementar la fertilidad, especialmente en los hombres, ya que se ha demostrado que este mineral aumenta la producción de semen y la motilidad de los espermatozoides.*

Efecto en la infertilidad masculina

El semen contiene altas concentraciones de selenio, lo cual se asocia con la función reproductora masculina. La deficiencia se asocia con una deficiente capacidad reproductiva en mamíferos y la suplementación con selenio mejora dicha capacidad.

El selenio es un elemento esencial para el desarrollo normal testicular, para la espermatogénesis, para la función y para la motilidad espermática. En los varones, el selenio es cofactor de las seleno-proteínas que participan como protectoras contra el estrés oxidativo, como es el caso de la glutatión peroxidasa, tioreductasas, desiodonidasas, sobre todo en los tirocitos, glándulas suprarrenales, testículos y ovario (55).

La enzima más conocida es la glutatión peroxidasa que se localiza en las células espermatogénicas, espermátidas y en el estadio postmeiótico en el testículo, contribuyendo a la estabilidad estructural de la cromatina condensada por medio de su actividad peroxidasa.

Las seleno-proteínas participan en el mantenimiento de la integridad estructural del espermatozoide. El incremento del selenio incrementa la actividad antioxidante de la glutatión peroxidasa, disminuyendo los ROS e incrementando la fertilidad masculina.

El selenio protegería al espermatozoide del daño oxidativo en el ADN y previene la lipoperoxidación de las membranas de las células espermáticas (76).

El consumo de selenio a dosis mayores a 600 mg/dL incrementa la motilidad, morfología y recuento de los espermatozoides. La deficiencia de selenio, precursor de la formación de glutatión peroxidasa, induce una reducción del número de espermatozoides vivos, rotura de la pieza intermedia e incrementa la formación de colas y cabezas defectuosas (23).

Ross, en 2010 (57) realizó un metaanálisis para evaluar el efecto del selenio como antioxidante en la infertilidad masculina y observó:

- El selenio ha sido utilizado como antioxidante único en sólo un estudio (77), el cual observó una mejoría en todas las variables espermáticas: concentración, motilidad y morfología.
- El selenio ha sido utilizado en combinación con otros antioxidantes en 4 estudios (67,77,62,69). La motilidad espermática mejoró en 3 de los 3 estudios (69,77,67), la concentración mejoró en uno de los 3 estudios (77), la morfología mejoró en uno de los 2 estudios (77) y la tasa de embarazo mejoró en uno de los dos estudios (62).

Actúa sinérgicamente con la vitamina E, protegiendo al espermatozoide de los efectos de la oxidación y mejorando la motilidad, la morfología y las tasas de embarazo.

Parece que la combinación de la vitamina E y el selenio tiene un mayor impacto sobre la motilidad comparado con la morfología. El selenio y la vitamina E, con frecuencia se combina con la vitamina C (33).

De todas maneras, los efectos exactos del selenio sobre la fertilidad masculina y la calidad seminal en humanos es todavía controvertida (41,77).

9. N- Acetil Cisteína

N-acetilcisteína (NAC) es una forma acetilada del aminoácido cisteína. Presenta una gran capacidad antioxidante gracias a que contiene un grupo tiol (-SH). Esta forma de cisteína es muy estable y se utiliza para reducir el estrés oxidativo.

En el interior del cuerpo humano la N-Acetil cisteína se convierte en la enzima antioxidante glutatión (GSH). En primer lugar la N-Acetil cisteína se convierte en cisteína y posteriormente se elevan los niveles de glutatión.

N-Acetil cisteína puede atravesar la membrana celular y ejercer su efecto en el interior de la célula y mantener unos niveles elevados de GSH intracelulares lo que disminuye las ROS y el estrés oxidativo.

También ha demostrado tener otras funciones importantes como capacidad anti-mutagénica y anticancerígena, por este motivo se emplea para proteger enzimas implicadas en la replicación y reparación del ADN.

Efecto en la infertilidad masculina (41)

La NAC juega un papel importante en la supervivencia de las células germinales en los túbulos seminíferos en humanos en estudios *in vitro*. Oeda et al. (1997) (57) encontraron que incubando semen de parejas con NAC durante 20 minutos, descendieron significativamente los niveles de ROS y mejoró la motilidad espermaíca.

Se ha descrito que el NAC mejora la concentración espermática y la reacción acrosómica, así como que reduce los niveles de ROS y la oxidación del ADN espermático, sin observar efectos en la motilidad y en la morfología.

En un estudio controlado y randomizado de Safarinejad and Safarinejad (2009) (77), observaron que el NAC junto con selenio, tenían un efecto aditivo beneficioso en la concentración espermática y en el porcentaje de morfología normal. Durante un periodo de 26 semanas de tratamiento mejoró significativamente la motilidad en el grupo de tratamiento combinado y en aquellos pacientes que recibieron únicamente selenio comparado con placebo. La combinación de tratamientos conduce a una mejora significativa en los parámetros seminales en comparación con los que utilizan solamente selenio.

Ross, en 2010 (57) realizó un metaanálisis para evaluar el efecto de la NAC como antioxidante en la infertilidad masculina y observó:

- La N-Acetil cisteína ha sido utilizada en dos estudios como antioxidante único (77) utilizando 600 mg diaria durante 26 semanas y (78) utilizando 600 mg diario durante 13 semanas). La motilidad espermática mejoró en ambos estudios, pero la concentración y la morfología mejoró solo en el estudio de Safarinejad and Safarinejad (2009) (77).
- El uso combinado de N-acetil cisteína ha sido utilizado en combinación con otros antioxidantes en dos estudios (61, 77). La motilidad espermática mejoró en un estudio (77), la concentración mejoro en ambos estudios, y la morfología mejoró solamente en un estudio (77). La tasa de embarazo no mostró mejoría en el estudio de Galatioto et al. (2008) (61).

10. Coenzima Q10 (Co-Q10)

Todas las células del cuerpo humano necesitan CoQ10. Obtenemos pequeñas cantidades de este nutriente a partir de nuestra dieta siendo el pescado y los aceites de pescado, las carnes (principalmente las vísceras) y los cereales

Antioxidantes

integrales, los alimentos más ricos en CoQ10. También es sintetizado en el organismo a partir de tirosina, fenilalanina y Acetil CoA.

Es una molécula con función bioenergética y antioxidante que de manera efectiva previene la oxidación de las proteínas, de los lípidos y del ADN.

Presente en todas las células del cuerpo, se encuentra en todas las membranas celulares, principalmente en la de la mitocondria, donde participa en la cadena de respiración aeróbica, generando energía en forma de ATP.

El 95% de la energía del cuerpo humano se genera de esta manera. Por lo tanto, los órganos con los requisitos más altos de energía, tales como el corazón, hígado y riñón, tienen las concentraciones más altas de CoQ10.

Inhibe la peroxidación lipídica al prevenir la formación de los radicales orgánicos lipídicos peroxilos. El ubiquinol (CoQH₂) forma reducida del CoQ10, reduce el radical de inicio perferilo, con la concomitante formación de la semiubiquinona y H₂O₂.

Esta extinción de la iniciación de la formación de radicales perferilo, previene la propagación de la peroxidación lipídica, protege no solamente a los lípidos sino también a las proteínas de su oxidación. Inhibe tanto la iniciación como la propagación de la oxidación de los lípidos y de las proteínas e inhibe, por tanto, el estrés oxidativo y sus consecuencias negativas sobre los espermatozoides.

Previene eficazmente la oxidación de las bases del ADN por el radical hidroxilo, generado durante la interacción en el estrés oxidativo del H₂O₂ con iones metálicos unidos al ADN, lo cual es particularmente importante en el caso de ADN mitocondrial de las células espermáticas, donde el daño oxidativo no es fácilmente recuperable.

La CoQ10 ha mostrado efectos beneficiosos en la diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas y peroxidación lipídica (79).

Efecto en la infertilidad masculina

La CoQ10 es un agente promotor de energía, se encuentra en las mitocondrias de la pieza intermedia del espermatozoide. En el fluido y en el plasma seminal se encuentran niveles elevados de CoQ10 y de su forma reducida, lo que se relaciona con la obtención de energía celular necesaria para que los espermatozoides tengan movilidad adecuada (80).

La CoQ10 recicla la vitamina E y previene la actividad prooxidante. La forma reducida de la CoQ10, el ubiquinol, también actúa como antioxidante previniendo la peroxidación lipídica. La CoQ10 se ha visto que inhibe la formación de peróxido de hidrógeno en el plasma seminal de hombres infértiles.

Se ha encontrado deficiencia de Coenzima Q en hombres infértiles con trastornos seminales como la motilidad. La administración oral de CoQ10 puede ser beneficioso en el tratamiento de la astenozoospermia, por su función en la cadena respiratoria mitocondrial y como antioxidante. De todas maneras, se necesitan más estudios controlados y randomizados para comprobar el efecto positivo de la CoQ10 oral en la motilidad espermática.

Los suplementos orales de 60 mg/día, muestran un incremento en la tasa de fertilización en inyección intracitoplasmática de esperma, en varones infértiles normospérmicos. A dosis de 10 mg/día incrementa el recuento así como la movilidad de los espermatozoides (55).

Los resultados de una revisión sistemática y un meta-análisis de la CoQ10 en la terapia en hombres infértiles (33), muestra que la suplementación oral con CoQ10 incrementa los niveles seminales de CoQ10, la concentración y la motilidad espermática. No se incrementó las tasas de embarazo.

11. Vitamina B12

Aunque la vitamina B12 es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales que se hallan de modo habitual en el organismo humano, el aprovechamiento de ésta es mínimo, ya que la síntesis ocurre en sitios muy distales del lugar de absorción fisiológica de la vitamina, lo que determina que prácticamente en su totalidad sea eliminada por las heces. Por lo que debe ser necesariamente aportada por los alimentos, cuya mayor fuente dietética se encuentra en las proteínas animales, ya que las frutas, los cereales y las verduras suelen carecer de B12, a menos que estén contaminadas con bacterias.

Los requerimientos mínimos diarios de vitamina B12 oscilan alrededor de los 2 µg, cantidad completamente cubierta por una alimentación mixta normal que contenga entre 5 y 30 µg de cobalamina, de los que se absorben de 1 a 5 µg. En el hombre, las reservas totales de cobalaminas (2-5 mg, aproximadamente 1 mg en el hígado) son mucho mayores que los requerimientos diarios.

Los beneficios, funciones y propiedades de la cianocobalamina son:

- Interviene en la absorción de hierro y en la formación de glóbulos rojos.
- Es indispensable en la síntesis de ADN, ARN, así como en la replicación celular
- Favorece la creación de creatinina.
- Esencial para el funcionamiento del sistema nervioso.
- Ralentiza la evolución de enfermedades neurodegenerativas.
- Importante para combatir el estrés y el decaimiento.
- Mantiene la espermatogénesis y es crucial para la diferenciación del tracto genital masculino. Es un iniciador de la meiosis, y su deficiencia bloquea el desarrollo de las espermatogonias durante la mitosis y bloquea la formación de espermatocitos en la meiosis. Se recomienda desde 1500 a 6000 µg/día. Su consumo sostenido durante más de tres meses incrementa la movilidad espermática y en un 27% mejora el recuento espermático (55).

12. Pentoxifilina

Es un inhibidor enzimático de la fosfodiesterasa y aumenta el AMP cíclico intracelular, estimulando la actividad de la proteincinasa dependiente de AMPc. También se sabe que es un inhibidor del factor de necrosis tumoral. Por ello se ha indicado para el tratamiento de las enfermedades del hígado causadas por el alcoholismo, en sustitución de los glucocorticoides y para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

Se está empleando en la terapia de la fertilidad como adyuvante debido a que esta incrementando el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en individuos con oligoastenozoospermia u oligoastenospermia.

Desciende la producción de ROS, preserva la motilidad espermática in vitro y mejora los parámetros seminales in vivo.

Tesarik et al. (1992) (84) demostraron que la pentoxifilina mejora la motilidad progresiva de los espermatozoides pero no incrementa el porcentaje de espermatozoides móviles en hombres astenospérmicos.

Okada et al. (1997) (85) estudiaron los efectos in vitro y in vivo de los tratamientos con pentoxifilina sobre los parámetros seminales de motilidad en hombres cuyos espermatozoides producían niveles estables de ROS. El tratamiento disminuyó la formación de ROS y preservó los parámetros seminales de motilidad in vitro (41).

13. L- Arginina

Este aminoácido no esencial, se encuentra en una gran diversidad de alimentos. Podemos encontrarla en alimentos como el arroz, los cereales y los frutos secos. Básicamente, podemos indicar que los alimentos más ricos en arginina son los alimentos proteicos.

Algunos de los principales beneficios de la arginina son:

- Fortalece el sistema inmunitario

Antioxidantes

- Regula las hormonas y el azúcar en sangre
- Puede disminuir el colesterol para mejorar la capacidad del aparato circulatorio
- Promueve y mejora la fertilidad masculina
- Necesaria para el buen funcionamiento del hígado
- Fundamental para el buen funcionamiento de la piel, las articulaciones y la musculatura
- Ayuda a la eliminación de las toxinas de nuestro cuerpo
- Promueve la producción de proteínas útiles para reparar el desgaste de los tejidos musculares
- Está involucrada en la síntesis de creatina, poliaminas y en el ADN
- Aumenta los niveles de la hormona del crecimiento

Es un aminoácido básico precursor de la síntesis de putresina y espermina, esenciales para la movilidad del espermatozoide. Se recomiendan alrededor de 4g por día. En el hombre tiene cierta influencia sobre el número de espermatozoides y su movilidad (55).

14. Carotenos:

- **Vitamina A**

La vitamina A proviene de fuentes animales como el huevo, la carne, la leche, el queso, la crema, el hígado, el riñón y el aceite de hígado de bacalao.

La vitamina A, es una vitamina liposoluble que interviene en la formación y mantenimiento de las células epiteliales, en el crecimiento óseo, el desarrollo, protección y regulación de la piel y de las mucosas.

La vitamina A es un nutriente esencial para el ser humano. Se conoce también como retinol, ya que genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina. Desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue. También se puede requerir para la reproducción y la lactancia.

- **Beta-carotenos**

El beta-caroteno es una sustancia presente en frutas y verduras, da el color naranja o rojo típico de algunas de ellas, naranjas, tomate o remolacha entre otros. Este pigmento se transforma en vitamina A y es un poderoso antioxidante que retrasa su envejecimiento de las células. Las fuentes de beta-caroteno son la zanahoria, la calabaza, la batata o camote, el melón, el calabacín, el pomelo o toronja, el albaricoque o albérchigo, el brécol o brócoli, la espinaca, en frutas y verduras de color.

Los carotenos son importantes en la protección de la membrana lipídica contra la oxidación y además, son precursores de la vitamina A y excelentes antioxidantes, especialmente contra radicales peroxilo e hidroxilo.

También actúan como secuestradores del oxígeno singlete. Los carotenoides trabajan sinérgicamente con el selenio y con la vitamina E y se ha recomendado una dieta de 1000 mg al día (National Academy of Sciences, 1989).

Se ha visto relación entre altas tasas en la eliminación de ROS con niveles altos en plasma de beta carotenos (86). Gupta and Kumar (2002) (87) observaron que una dosis dos veces al día de 200mg durante 3 meses, muestra una mejora estadísticamente significativa en la concentración espermática en el 66% de los pacientes y en la motilidad en el 53% de los pacientes.

En aquellos con una concentración espermática muy baja, fracasó como para atribuir esa mejora a la terapia, pero concentraciones espermáticas más altas se asociaron con mejoras significantes y resultaron 6 embarazos en 26 pacientes.

Se necesitan estudios mas numerosos, controlados y randomizados para establecer que subgrupos de pacientes se beneficiarían del tratamiento con carotenos(41).

- **Licopeno**

Antioxidantes

A diferencia de otros carotenoides como el α - y β -caroteno, el licopeno no tiene actividad de pro-vitamina A debido a que carece de la estructura de anillo γ -iónico común en estos carotenoides.

Se encuentra en la naturaleza como pigmento natural liposoluble responsable del color rojo y naranja de algunas frutas y verduras. Se sintetiza exclusivamente por las plantas y los microorganismos y una de sus funciones principales es absorber la luz durante la fotosíntesis para proteger a la planta contra la fotosensibilización.

Una de sus fuentes principales es el tomate (80-90%). Otras fuentes importantes son la sandía, la toronja rosada, la guayaba rosada, el pimiento rojo y la papaya.

Además de estar presente en los alimentos, se encuentra distribuido en mayores cantidades en el suero humano (21- 43% de los carotenoides totales) y los diferentes tejidos (hígado, riñón, glándulas renales, testículos, ovarios y próstata) (81).

Actúan como un antioxidante, por lo que puede atrapar especies reactivas de oxígeno (EROS) y reducir el estrés oxidativo y el peligro de oxidación de los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ADN.

Se ha sugerido una ingesta diaria de 5-10 mg/día. Es dos veces más potente que el beta-caroteno y 10 veces más potente que la vitamina E, como eliminador de oxígeno singlete, inhibiendo la peroxidación lipídica en plasma seminal.

Se encuentran altas concentraciones de licopeno en testículos y plasma seminal y menores niveles en hombres infértiles (41).

Se ha reconocido al licopeno como un poderoso antioxidante y su papel preventivo en las enfermedades crónicas provocadas por el estrés oxidativo,

por lo que investigadores han empezado a estudiar su capacidad como protector del daño oxidativo en el espermatozoide, evitando así la infertilidad.

- ***Astaxantina***

Es un extracto carotenoide extraído del alga *Hemaococcus pluvialis* y tiene mas capacidad quelante de oxígeno singlete que la vitamina E.

En un estudio reciente controlado, randomizado y doble ciego se administró un carotenoide compuesto por Astaxantina a una dosis de 16 mg al día durante 3 meses, resultando un incremento total (54.5% comparado con 10.5%) y por ciclo (23.1% comparado con 3.6%) en las tasas de embarazo comparado con el grupo placebo, pero ninguno de los tres parámetros seminales mostró mejoría después del tratamiento (82).

Actualmente, se están utilizando antioxidantes en el tratamiento de hombres infértiles, aunque la evidencia para esta práctica es poco clara. En 2010 se realizó una revisión sistemática de estudios randomizados para evaluar rigurosamente la evidencia actual de los efectos de los antioxidantes orales (vitaminas C y E, zinc, selenio, folato, carnitina y carotenoides) en la calidad espermática y en la tasa de embarazo en hombres infértiles (57).

De los 16 estudios que examinan el efecto de los antioxidantes orales sobre variables seminales, 12 (75%) muestran mejoras en al menos un parámetro seminal comparado con placebo o no tratamiento. 10 de los 16 estudios (63%) muestran una mejora significativa en la motilidad espermática comparada con placebo (73,74,88,67,89,59,77,69,64), 5 de los 15 estudios (33%) mostraron una mejora en la concentración espermática (74,61,59,77,58) y 2 de los 12 estudios (17%) mostraron mejoras en la morfología espermática (74,77).

Diez estudios, incluyendo 783 hombres randomizados, examinaron el efecto de los antioxidantes orales en la tasa de embarazo. 9 de los 10 estudios mostraron resultados de embarazos espontáneos (73,74,82,61,89,59,68,69,64) y en general, una significativa mayor tasa de embarazo en el grupo de tratamiento

comparado con el control (19% (69/368) versus 3% (9/317), OR = 7.9, 95% CI 3.9–16.1, P < 0.0001). Un estudio (62) observó resultados después del tratamiento con ICSI mostrando una mayor tasa de embarazo viable por embrión.

En conclusión, la revisión sistemática de la evidencia en estudios controlados y randomizados sugiere que la suplementación oral con antioxidantes puede mejorar la infertilidad masculina mejorando algunos parámetros seminales y la probabilidad de embarazo. Esta mejoría, no es consistente y hay una disponibilidad muy amplia de tratamientos y pautas utilizadas.

Se necesitan estudios mas numerosos, controlados y randomizados para estandarizar las dosis de un tratamiento oral especifico antioxidante y para evaluar la tasa de embarazo tanto de forma espontánea como después de un TRA en hombres infértiles.

Es importante que estos estudios utilicen criterios estrictos de inclusión y de exclusión y una metodología estandarizada para ayudar a conocer si un grupo especifico de hombres infértiles se benefician de la terapia antioxidante (57).

Altas dosis de antioxidantes deberían ser evitadas debido a los posibles efectos adversos resultantes. Por ejemplo, altas dosis de vitamina C reducen los puentes disulfuro en la protamina de la cisteina y consecuentemente la descondensación del ADN en espermatozoides. El selenio a altas dosis, reduce significativamente el numero de espermatozoides móviles en hombres fértiles posiblemente a través de modificaciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas (83).

JUSTIFICACIÓN

*La **salud reproductiva** es definida por la OMS como un estado de bienestar físico, mental y social en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo y en todas las etapas de la vida.*

La salud reproductiva implica que las personas puedan tener una sexualidad segura y satisfactoria, reproducirse con libertad, decidir cuándo tener hijos y elegir libremente cuántos desean tener. La infertilidad conlleva la pérdida de la libertad de la persona para tener hijos, altera su bienestar y causa una pérdida de la salud reproductiva.

Se cree que 80 millones de personas en el mundo son incapaces de tener niños y el retraso de la maternidad afecta al 15% de las parejas que están intentando concebir. El factor masculino de **subfertilidad** supone el 50% del total de los casos. Un hombre de cada veinte, estará afectado de subfertilidad.

Los términos de esterilidad, infertilidad e infecundidad se utilizan indistintamente dependiendo de si se aplican con fines médicos, demográficos o sociales.

La OMS y el *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART)*, definen **esterilidad e infertilidad** como la enfermedad del sistema reproductivo consistente en la incapacidad para lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas. Se estima que afecta aproximadamente a una de cada seis parejas en edad fértil.

*La **reproducción asistida** comprende todos los tratamientos o procedimientos que implican la manipulación tanto de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos para el establecimiento de un embarazo.*

Incluye la fecundación in vitro e ICSI, la criopreservación de ovocitos y embriones y la donación de ovocitos y embriones. En España, la inseminación artificial con espermatozoides de la pareja o de donante también está considerada TRA.

La prolongación de la vida de la mujer y la mejora de su salud, general y reproductiva, no se ha acompañado de una prolongación de su vida fértil, y la edad de menopausia se mantiene en torno a los 50 años.

La mujer ha estrechado considerablemente su periodo reproductivo al iniciar más tarde la búsqueda del primer hijo y al no alterarse la edad de la menopausia, y además lo ha desplazado hacia la franja menos fértil de dicho periodo, la que se sitúa por encima de los 35 años.

No existe en la sociedad conciencia sobre la importancia de la edad de la mujer para la fertilidad, y se considera que la maternidad puede retrasarse, por encima de los 35 años. Este factor ha hecho que la demanda de tratamientos de reproducción asistida (TRA) aumente cada año.

Los cambios sociales experimentados, entre los cuales sobresalen los nuevos roles de la mujer y la accesibilidad a la anticoncepción, están propiciando una reducción de la natalidad y un retraso en la edad de la mujer para tener el primer hijo.

La incidencia mundial de la infertilidad masculina se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a diversas causas, algunas de origen genético y otras asociadas a la exposición a agentes nocivos.

A nivel mundial, uno de cada veinte hombres es infértil. De ahí que el estudio de los mecanismos fisiopatológicos que están involucrados en la infertilidad masculina será de vital importancia para la aplicación de estrategias terapéuticas, ya que es conocido que la población mundial envejece al mismo tiempo que disminuye cada vez más la natalidad.

El **estrés oxidativo** ha sido identificado como un factor destacado que contribuye a la reducción de la fertilidad masculina, demostrándose que, concentraciones elevadas de radicales libres de oxígeno (RL), inducen procesos de peroxidación en las membranas de los espermatozoides, afectando a parámetros como la movilidad y morfología.

La infertilidad se ha relacionado con un desequilibrio entre la generación de RL de oxígeno y los sistemas antioxidantes naturales.

Las recomendaciones habituales para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo incluyen la ingesta de **antioxidantes**. Entre un 30-80% de los casos de subfertilidad masculina se consideran que son debidos al efecto dañino del estrés oxidativo sobre el espermatozoide.

Diversos estudios clínicos han evaluado los efectos del tratamiento con suplementos antioxidantes por vía oral sobre la calidad espermática en el varón, así como en los procesos de fertilización in vitro (FIV) y tasas de embarazo obtenidas.

A pesar de que no existe uniformidad en cuanto al diseño de estos estudios clínicos ni en los suplementos utilizados, que permitan comparar los resultados obtenidos para poder establecer la suplementación óptima en la dieta, las revisiones más recientemente publicadas permiten concluir acerca de resultados positivos en el porcentaje de embarazos o de recién nacidos tras la ingesta de suplementos antioxidantes.

Estos estudios han confirmado el efecto beneficioso demostrado por los antioxidantes en trabajos previos en los que se analizaba su efecto sobre la calidad seminal.

El uso de suplementos dietéticos se ha extendido en los TRA en la infertilidad masculina a pesar de la necesidad emergente de realizar estudios clínicos controlados y randomizados que puedan poner de manifiesto la eficacia clínica de estos suplementos antioxidantes en la fertilidad masculina.

En la actualidad, existen comercializados distintos suplementos alimenticios utilizados en Andrología que contienen en su composición agentes antioxidantes reconocidos, principalmente vitaminas y minerales

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El tratamiento oral con antioxidantes ácidos grasos únicos omega 3 o combinados, administrado a varones subfértiles diagnosticados de astenospermia idiopática leve o severa, mejora la concentración y motilidad espermática, y aumenta la tasa de embarazo y de niño nacido vivo sano, en parejas estériles que precisan de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), bien Fertilización In Vitro-ICSI (FIV-ICSI) o Inseminación Artificial Conyugal (IAC).

OBJETIVOS

Los objetivos que vamos a definir se diseñaron en el año 2011, en base a las sugerencias y recomendaciones extraídas de las revisiones y meta-análisis existentes en la literatura científica mundial, encabezados por la prestigiosa librería Cochrane, que revisó todas las publicaciones que estudian el papel de los antioxidantes orales administrados a varones con subfertilidad.

Aunque el objetivo final de las TRA es alcanzar un embarazo, tal embarazo no va siempre seguido del nacimiento de un niño vivo y sano, debido a la elevada tasa de aborto existente en el ser humano. En los últimos años, dentro del ámbito de la Medicina de la Reproducción, se está proponiendo que la tasa de niño nacido vivo y sano debe ser el objetivo primario (*endpointprimary*) en los estudios de infertilidad, pero la inmensa mayoría de publicaciones establecen el éxito de estas técnicas, en conseguir simplemente un test de embarazo positivo (β -hCG positiva).

Sólo el 22% de todos los estudios clínicos controlados y randomizados realizados en reproducción humana, informan de tasas de embarazo clínico y de nacido vivo (127).

Por todo ello, centramos nuestro estudio, únicamente en varones subfértiles tratados con antioxidantes que precisan Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), pues no hay prácticamente información de ello. Sólo disponemos de 4 publicaciones, 3 en FIV-ICSI y 1 en IAC.

Cuando los autores diseñan los objetivos de sus estudios, la tasa de embarazo es muy poco estudiada. Algunos estudios informan de tasa de embarazo clínico (latido cardíaco positivo por ecografía), y únicamente 4 publicaciones tienen como uno de sus objetivos la tasa de nacido vivo sano (2 son embarazos naturales y sólo 2 con FIV-ICSI).

Tan sólo existen 7 estudios comparativos entre antioxidantes (*head to head*), pero ninguno de ellos informa de tasas de embarazo clínico y mucho menos de tasas de nacido vivo sano, y ninguno existe comparando antioxidante único ácido graso omega 3 con antioxidantes combinados.

Objetivos

En el año 2011, se comercializa en España el ácido graso omega 3 (DHA), como preparado con un único antioxidante para la subfertilidad masculina. Hasta ese momento no existía ningún estudio clínico que informara de sus potenciales efectos y menos en reproducción asistida, y hoy apenas existen. Ha constituido uno de nuestros principales grupos de tratamiento analizados.

Tampoco existe información sobre los potenciales efectos adversos gestacionales, fundamentalmente la tasa de aborto en parejas en que el varón toma antioxidantes (sólo existen 3 publicaciones con muy poco numero de casos y que solo mencionan los abortos, sin más).

Respecto al estudio de los potenciales cambios de los parámetros seminales después de tomar antioxidantes, los estudios son muy numerosos, pero inconsistentes en su inmensa mayoría con resultados contradictorios, siendo la calidad de las evidencias bajas o muy bajas.

No hay ningún análisis o comentario respecto a la variable tiempo de administración (días o meses), y su relación con los resultados.

1. OBJETIVOS PRINCIPALES (*primary endpoints*)

1.1. Valorar los **Parámetros Clínicos** de éxito:

1.1.1. **Tasa de niño nacido vivo y sano a término**: definida por el nacimiento de al menos un niño vivo y sano de mas de 36 semanas de gestación.

1.1.2. **Tasa de nacido viable**: definida por la existencia de un niño nacido después de la semana 20 de gestación con signos presentes de vida.

1.1.3. **Tasa de embarazo clínico**: definido por la observación con ecografía vaginal de un saco gestacional con latido cardiaco como mínimo en la semana 7 de gestación.

Objetivos

1.1.4. **Tasa de embarazo químico**: definida por un análisis de β -hCG en sangre mayor de 50 mU.

Para establecer estas definiciones, hemos seguido las existentes en la base de datos de la prestigiosa Cochrane MDSG (*Menstrual Disorders and Subfertility Group*). Archie. The Cochran Collaboration. Available at: <http://www.archie.cochrane.org>. Last accessed September 15, 2010.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS (*secondary endpoints*)

Estos objetivos se establecieron al realizar un primer seminograma con capacitación (REM) en el momento del inicio del tratamiento antioxidante del varón, y repetir un segundo seminograma y REM el día de la finalización del tratamiento del varón, que coincide con la realización de la TRA, bien IAC o ICSI.

2.1. Valorar los **Parámetros Seminales** pretratamiento y postratamiento:

2.1.1. **Concentración (M/ml)**

2.1.2. **Movilidad Progresiva (%)**

2.2. Valorar los **Parámetros de Laboratorio Ovocitarios** (sólo en los ciclos de ICSI).

2.2.1. **Número de ovocitos aspirados**

2.2.2. **Número de ovocitos metafase II (MII)** microinyectados

2.3. Valorar los **Parámetros de Laboratorio Embrionarios** (sólo en los ciclos de ICSI).

2.3.1. **Tasa de Fertilización (%)**

2.3.2. **Grado de Calidad Embrionaria** según criterios de ASEBIR: A, excelente; B, buena; C, regular; y D, mala, el día de la transferencia.

Objetivos

2.3.3. **Tasa de Embriones Viables** el día de la transferencia (%).

2.3.4. **Tasa de Implantación** (número de sacos gestaciones vistos en ecografía en relación al número de embriones transferidos) (%).

2.4. Valorar los **Efectos Adversos de la Medicación Antioxidante** según el Diccionario Médico de Actividades Regulatorias.

Valoración de la seguridad

La seguridad y tolerancia de los fármacos se cuantificará en función de la incidencia de acontecimientos adversos. Se determinarán la frecuencia de efectos adversos con cada principio activo y el porcentaje de los mismos que causa retirada del sujeto del estudio.

Pueden producirse acontecimientos adversos en pacientes seleccionados durante cualquier período: basal, anterior a la asignación, como resultado de una intervención especificada en el protocolo, la dieta. Tales acontecimientos fueron registrados en cada visita y anotados en el cuaderno de recogida de datos de acontecimientos adversos.

En caso de detección de Efectos Adversos Graves, se suspenderá la medicación utilizada, y el sujeto no recibirá el tratamiento.

2.5. Valorar los **Efectos Adversos Gestacionales**

2.5.1. **Tasa de aborto**

2.6. Describir las **características del parto y de los recién nacidos sanos**.

MATERIAL Y MÉTODO

1. ENFERMEDAD A ESTUDIO

Subfertilidad masculina, debida a astenozoospermia idiopática tanto de grado leve como grave, que precisa de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) para conseguir un embarazo.

.

2. LUGAR DE REALIZACIÓN

Este *estudio clínico*, se ha realizado en la Unidad de Reproducción Asistida Hospital La Vega en Murcia. Esta Unidad de Reproducción (UR) desarrolla su actividad en el ámbito de la medicina privada, con parejas que de modo libre, eligen a sus profesionales para que los estudien, diagnostiquen la causa de su esterilidad, y procedan a realizar la TRA, que según su criterio, consideren más adecuada, para conseguir el nacimiento de un niño vivo y sano. Es una unidad unicéntrica y multidisciplinar que cuenta con más de 15 profesionales médicos y biosanitarios, como: ginecólogos expertos en medicina de la reproducción, andrólogo, anestesistas, embriólogos, enfermeras, auxiliares clínicas y personal administrativo. El Director de la unidad, tiene una experiencia de 30 años en reproducción, primero a nivel experimental y después a nivel clínico, tanto dentro de la medicina pública como privada, con más de 50 publicaciones científicas en este campo, más de 100 ponencias como invitado a congresos nacionales e internacionales, y fue miembro vocal de la Junta Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad durante 8 años.

3. SELECCIÓN DE PACIENTES

Desde Mayo del 2011 hasta Mayo del 2014, se realizó el reclutamiento y selección de pacientes, se completó el desarrollo del estudio, hasta su finalización. Durante este periodo de 3 años, realizaron una primera visita por esterilidad de cualquier causa a la UR, 750 parejas (en algunos casos, también mujeres solas).

Esta primera visita, era en la mayoría de casos, informativa, donde se explicaba por parte del ginecólogo clínico, aspectos generales de la reproducción, se hablaba superficialmente de las TRA, y se les informaba de los costos económicos de estos tratamientos.

Las parejas que volvían a una segunda visita, era porque tenían confianza en nuestra unidad, económicamente podían afrontar sus costos, y se ponían en nuestras manos para iniciar el estudio de su problema. Estas parejas consultaban por esterilidad primaria o secundaria.

La esterilidad fue definida por la imposibilidad de concebir tras un año de relaciones sexuales sin método anticonceptivo con la misma pareja. Tras realizar el estudio diagnóstico básico de esterilidad a la pareja: seminograma con capacitación (REM), estudio de reserva ovárica (estradiol, FSH, AMH, y conteo folicular en días 3-5 del ciclo) e HSG, se les citaba a una tercera visita, donde se comentaba la causa del problema y se indicaba la TRA más adecuada según cada caso.

Era en esta tercera visita, cuando se iniciaba la selección de las parejas candidatas a iniciar *el estudio clínico abierto, prospectivo y randomizado*.

El criterio de selección fue, varón subfétil con astenospermia idiopática leve o grave, como único problema reproductivo de la pareja.

3.1. TIPOS DE PACIENTES

3.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ❖ **Hombres:** que acudían a la UR del Hospital La Vega con su pareja femenina con el deseo de ser padres. El motivo de consulta era un año o más buscando gestación sin conseguirla y sin oponer ningún método contraceptivo. Sus edades estaban comprendidas entre **20 y 48 años**.

Se seleccionaron tras realizar un seminograma con capacitación (REM), siempre por embriólogos de la unidad. *El criterio básico de inclusión era*

un seminograma patológico, que tenía que informar de astenospermia, según los últimos criterios establecidos por la OMS en 2010.

Todos los varones tenían que estar exentos de antecedentes personales, genéticos, médicos, quirúrgicos, o tóxicos, que justificasen la alteración seminal.

Se realizó un estudio andrológico al varón que resultó normal.

Estos varones eran incluidos y diagnosticados de astenospermia de causa “idiopática” (movilidad progresiva < 32%).

- ❖ **Mujeres:** acudían con su pareja masculina a la UR con el deseo de ser madres, tras un año o más sin conseguirlo. Se incluyeron mujeres con edades comprendidas entre **20 y 40 años**.

No tenían causa aparente de esterilidad que se evidenciase en el estudio diagnóstico protocolizado anteriormente mencionado realizado en nuestra UR.

3.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSION

- ❖ **Hombres:** seminograma normal, edades inferior a 20 o superior a 48 años, historia de cáncer con tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia, toma de cualquier fármaco o droga citotóxica o inmunosupresores de modo habitual, enfermedad genital como la criptorquidia, varicocele, inflamaciones genitales, historia de cirugía genital, enfermedades del sistema nervioso central, eyaculación retrógrada, enfermedades de transmisión sexual, infecciones genitourinarias (epididimoorquitis, prostatitis), leucocitospermia (más de un millón de leucocitos por ml), traumas testiculares, torsión testicular, problemas médicos concomitantes conocidos que puedan influir en la fertilidad, enfermedad hepatoiliar, insuficiencia renal significativa, exposición habitual conocida y persistente a sustancias medioambientales tóxicas para el espermatozoide.

Material y Método

También fueron excluidos del estudio pacientes con enfermedades neurológicas o psiquiátricas que a criterio del clínico tenían entidad suficiente que comprometieran los resultados.

Los varones fumadores fueron excluidos del estudio.

Abuso de alcohol o dependencia a él, historia de cualquier anomalía endocrina, un índice de masa corporal igual o mayor de 30 Kg/m².

Los pacientes con azoospermia, teratozoospermia, o que tomaban antioxidantes previamente, también fueron excluidos del estudio.

A un pequeño número de pacientes con astenospermia severa, se les realizó cariotipo. Aquellos con anomalías genéticas fueron excluidos.

- ❖ **Mujeres:** no participaron aquellas mujeres con edad superior a 40 años, o que tuvieran cualquier enfermedad ovárica, tubárica o de cualquier causa que condicionase esterilidad.

Fueron excluidas mujeres con obesidad (IMC>30), ovarios poliquísticos, endometriosis, o que precisaran donación de ovocitos.

También se excluyó la esterilidad de causa desconocida.

Otros motivos de exclusión:

- Parejas que acudían a la UR para screening genético preimplantacional (SGP), ciclos de criotransferencia embrionaria (CT), ciclos con ovocitos vitrificados, ciclos con semen congelado propio o donado, y ciclos con biopsia testicular.

- También se excluyeron ciclos que se iniciaron pero que no llegaron a transferencia embrionaria, ya que el objetivo principal del estudio era analizar la tasa de niño nacido vivo y sano tras transferencia (fueron fallos de estimulación ovárica, fallo de punción sin ovocitos, fallos en la división embrionaria sin

embriones viables para transferir, o fallos de la propia técnica de la transferencia).

4. DISEÑO DEL ESTUDIO

Todas las parejas incluidas, una vez estudiadas, según nuestro protocolo de trabajo, tenían que precisar de TRA bien ICSI (microinyección espermática del ovocito) o IAC (inseminación artificial conyugal).

El criterio para indicar IAC ó ICSI lo estableció el resultado de la capacitación espermática (REM).

Si la recuperación espermática (REM) era igual o superior a 5 M (millones) de espermatozoides, lo considerábamos como astenospermia idiopática “leve” y se indicó IAC. Si la REM era inferior a 5 M, lo considerábamos como astenospermia idiopática “grave” y se indicó ICSI.

En los ciclos de IAC, sólo se incluyeron aquellas parejas que llegaban al día de la inseminación. En los ciclos de ICSI, sólo se incluyeron aquellas parejas que llegaron a la transferencia embrionaria.

En resumen, se incluyeron parejas que consultaban en la UR Hospital La Vega, por esterilidad primaria o secundaria de más de un año de duración, sin causa aparente de problema femenino y el varón era diagnosticado de esterilidad aparentemente “astenospermia idiopática” bien leve o grave, que precisaba de TRA bien IAC o ICSI según criterio de la REM, y que todas llegaran a realizarse la inseminación o la transferencia embrionaria.

*Con este criterio, se incluyeron **179 varones con astenospermia idiopática**, de edad 36.2 ± 5.0 años (media \pm SD), que fueron reclutados junto a su pareja, para este estudio, realizando en ellos un total de **259 ciclos de TRA**.*

*Separando según TRA: en **ICSI** participaron **124 varones (con sus parejas)**, realizando un total de **162 ciclos**. En **IAC**, **55 varones (con sus parejas)**, realizando un total de **97 ciclos**.*

4.1. RANDOMIZACION

Estudio clínico abierto, prospectivo, randomizado, doble ciego, unicéntrico, de tres grupos paralelos:

- A) Control o no tratamiento del varón.
- B) Varón tratado con Antioxidante Único Ácido Graso Omega 3.
- C) Varón tratado con Antioxidantes Combinados.

Método de randomización: aleatorio simple.

Los principios activos utilizados estaban registrados, comercializados y en condiciones de uso autorizadas.

Se solicitó la participación en este estudio a los ***pacientes varones subfértiles de causa astenospermia idiopática leve o severa***, que acudían a las consultas de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital La Vega (Murcia) durante un periodo de 3 años, y que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión del estudio.

Todas las parejas consultaban por esterilidad primaria o secundaria y estaban dispuestos a realizarse la TRA indicada y más conveniente.

4.2. MEDICACIÓN EN ESTUDIO

Se define como medicación en estudio "todos los tratamientos administrados con motivo de una investigación".

En este estudio los medicamentos a investigar son complementos alimenticios nutracéuticos con actividad antioxidante, fundamentalmente, ácidos grasos omega 3 (DHA) y omega 6 (EPA), más vitaminas, A, B6, B9, B12, C, E, zinc, selenio, licopeno, arginina y coenzima Q10.

Descripción de los antioxidantes utilizados en el estudio:

a) Antioxidante Único

- **Denominación genérica:** DHA (ácido docosahexaenoico). Ácido Graso Omega 3.
- **Nombre comercial:** GestaDha®
- **Principios activos:** DHA de microalga Schizochytriumsp.
- **Excipientes:** ninguno. No contiene gluten, lactosa ni sacarosa.
- **Forma farmacéutica:** cápsulas de gelatina blanda sin lactosa, ni sacarosa ni gluten con 200 mgrs de DHA.
- **Dosis:** 200 mgrs cada 12 horas. Dosis total: (400 mgrs/día).
- **Vía de administración:** oral.
- **Presentación:** 30 cápsulas.
- **Grupo Terapéutico (ATC):** complemento nutracéutico. No sustituye a una alimentación equilibrada ni a un estilo de vida saludable.
- **Entidad elaboradora:** Gynea Laboratorios SL

b) Antioxidantes Combinados

- **Denominación genérica:** antioxidantes.
- **Nombre comercial:** Andromás®
- **Principios activos:** Fructosa, Aceite de pescado, Acetilcarnitina, Arginina base, Aromas (aroma de naranja, aroma tropical), Vitamina C (Ácido-L - Ascórbico), Vitamina E (Acetato de D-alfa tocoferilo), Aroma (Aroma natural), Sulfato de zinc, Coenzima Q10, Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), edulcorante (sucralosa), Beta-caroteno, Vitamina B12 (Cianocobalamina), Vitamina B6 (Clorhidrato de piridoxina), Vitamina B9 (Ácido pteroilmonoglutámico) y Selenito de sodio.

- **Excipientes:** Aromas de naranja, tropical, y natural, sucralosa y fructosa.
- **Forma farmacéutica:** sobres. Un sobre contiene: proteínas 2gr, hidratos de carbono 2,78gr, lípidos 0,3gr, omega 3 (DHA/EPA) 250/350mg, L-acetil carnitina 1000mg, L-arginina 1000mg, Coenzima Q10 50mg, vitamina C 180mg, vitamina E 30mg, ácido fólico 0,4mg, zinc 20mg, selenio 0,105mg, vitamina B6 2,06mg, vitamina B12 3mcg, licopeno 1mg, vitamina A (retinol) 240mcg.
- **Dosis:** 1 sobre al día.
- **Vía de administración:** oral.
- **Presentación:** 30 sobres
- **Grupo Terapéutico (ATC):** complemento alimenticio.
- **Entidad elaboradora:** Laboratorios EFFICK SA.

En este diseño doble ciego con medicaciones distintas, se utilizaron formas farmacéuticas comercializadas por los laboratorios que los fabrican.

4.3. DESCRIPCIÓN DEL PLAN DE TRATAMIENTO

- ***Visita de selección y de inicio de tratamiento***

El clínico durante la visita de valoración de las pruebas diagnósticas de esterilidad de la pareja, en aquellos casos de varones con astenospermia idiopática, sin ningún antecedente que lo justificase (ver criterios de inclusión y exclusión), y siempre que la mujer no tuviera ninguna causa evidente de esterilidad (ver criterios de inclusión y exclusión), y en las parejas que cumplían todos los requisitos de selección, se iniciaba un sistema de randomización aleatorio simple dirigido al tratamiento del varón, diseñando tres grupos de estudio:

ningún tratamiento médico al varón, tratamiento con antioxidante único, o tratamiento con antioxidantes combinados.

Los pacientes varones que eran seleccionados en el grupo de tratamiento antioxidante, eran informados de iniciar al día siguiente del diagnóstico de su alteración seminal, la medicación prescrita en receta médica, a adquirir en las oficinas de farmacia, pues estaban comercializadas y distribuidas por los laboratorios farmacéuticos responsables.

La **duración del tratamiento** fue totalmente variable y diferente en cada paciente, pues se iniciaba en el momento del diagnóstico de la alteración seminal y finalizaba el día en que se realizaba la TRA elegida, bien IAC o ICSI.

Este periodo ha sido variable, pues dependía del protocolo de tratamiento de estimulación ovárica previo a la TRA, variando en función de fecha de inicio de la regla, protocolo de agonistas o antagonistas con o sin anticonceptivos previos, y sobre todo de cuando les venía mejor hacerse el ciclo de TRA en base a temas laborales o económicos.

Este aspecto de la duración del tratamiento, no ha sido apenas valorado en el resto de estudios similares realizados hasta la fecha, y no existen trabajos que comparen diferentes periodos de tiempo de tratamiento.

El tipo de diseño de este estudio, sin pretenderlo en un principio ni tenerlo definido en sus objetivos, ha permitido analizar el factor “duración del tratamiento,” relacionándolo con sus objetivos gestacionales y seminales.

▪ **Periodo de lavado**

En realidad no ha existido ningún periodo de lavado pues si algún varón ya tomaba previamente alguna medicación antioxidante, era excluido del estudio.

▪ **Período de tratamiento activo**

En la visita inicial del periodo basal, se asignó aleatoriamente a los pacientes elegibles que aceptaron participar en el estudio, a uno de los tres grupos de estudio y se les recetó la medicación asignada: Gesta DHA® 1 cápsula oral

cada 12 horas, Andromás 1 sobre oral al día, o ningún tipo de tratamiento.

▪ ***Justificación de las dosis seleccionadas***

Las dosis seleccionadas, y que se indican a continuación, para cada uno de los complementos nutricionales en estudio, han sido elegidas en consonancia con las posologías aconsejadas que figuran en las fichas técnicas de estos fármacos, aprobadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

a) *Gesta DHA®*

La dosis que recomendamos de Gesta DHA® como antioxidante y antiinflamatorio en el varón, fué de 400 mg/día, repartidos en dos tomas de 200 mg cada 12 horas. La duración fue variable, iniciándose el día del diagnóstico y finalizando el día de la inseminación o de la transferencia embrionaria.

b) *Andromás®*

La dosis de Andromás®, recomendada para mejorar la calidad espermática fue de 1 sobre oral al día. A igual que con el Gesta DHA®, se iniciaba el día del diagnóstico y finalizaba el día de la inseminación o de la transferencia embrionaria.

4.4. NÚMERO DE PACIENTES Y NÚMERO DE CICLOS DE TRA

Todo el estudio descriptivo de los resultados y analítico, se ha expresado en base a número de ciclos de TRA y no a número de varones o parejas tratadas con TRA.

GRUPO:	CONTROL		ANTIOXIDANTE ÚNICO		ANTIOXIDANTES COMBINADOS	
	IAC	ICSI	IAC	ICSI	IAC	ICSI
TRA:						
	51	78	18	41	28	43
	129		59		71	

Tabla 1. Número de ciclos de TRA realizados tanto IAC como ICSI en los tres grupos de estudio: control, antioxidante único y antioxidantes combinados.

Se han realizado y analizado de modo completo (desde el inicio del tratamiento hasta la finalización de la TRA, con o sin niño nacido vivo sano), **259 ciclos de TRA, 162 ciclos de ICSI y 97 ciclos de IAC.**

El número de ciclos de TRA estudiados según los grupos randomizados han sido:

grupo control o no tratamiento, 129 ciclos y grupo antioxidantes en general, 130 ciclos (antioxidante único 59 ciclos y antioxidantes combinados 71 ciclos).

Respecto a número de ciclos de TRA analizados en cada grupo han sido: control (ICSI 78 ciclos e IAC 51 ciclos); antioxidantes totales, únicos más combinados (ICSI 84 ciclos e IAC 46 ciclos); antioxidante único (ICSI 41 ciclos e IAC 18 ciclos); antioxidantes combinados (ICSI 43 ciclos e IAC 28 ciclos).

El tamaño de la muestra se ha establecido de forma que tenga una potencia del 80% para llegar a la conclusión de equivalencia de la pauta de antioxidante único con respecto a la pauta de antioxidantes combinados, con un riesgo de concluir incorrectamente la no equivalencia igual al 5%, y permitir una tasa de retiradas del 10% en el estudio.

4.5. DURACIÓN DEL TRATAMIENTO DEL VARÓN

Variable y diferente en cada varón y ciclo de TRA, como hemos indicado anteriormente.

Días de Tratamiento en ICSI y en IAC

	Ciclos	Mínimo Días	Máximo Días	Media+DT Días
Antiox. Único ICSI	41	15	385	120,2± 85,1
Antiox. Único IAC	18	20	364	125,6± 82,4
Antiox. Comb. ICSI	43	10	392	135,3± 96,2
Antiox. Comb. IAC	28	18	336	121.5± 88,4

Tabla 2. Duración del tratamiento en días, valorando la duración mínima, la máxima y la media con la desviación típica ($p>0.05$).

En **ICSI**, con antioxidante único se han realizado 41 ciclos de tratamiento con una duración media de 120,2 días. Con antioxidante combinado se han realizado 43 ciclos con una duración media de 135,3 días.

En **IAC**, con antioxidante único se han realizado 18 ciclos de tratamiento con una duración media de 125,6 días. Con antioxidante combinado se han realizado 28 ciclos con una duración media de 121,5 días.

No se han encontrado diferencias significativas en los días de tratamiento entre el antioxidante único y el combinado, ni en ICSI ni en IAC.

4.6. CUMPLIMIENTO TERAPEUTICO

Ningún paciente varón abandonó el tratamiento.

4.7. DURACIÓN DEL PERIODO DE ESTUDIO

La duración aproximada del período del estudio fue de unos 36 meses:

- Entrada del primer paciente: Mayo de 2011.
- Fecha de finalización de la inclusión: Mayo de 2014.

5. METODOLOGÍA DE LAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

5.1. SEMINOGRAMA

El análisis básico del semen, nos informó sobre el estado del mismo, diagnosticando la existencia de un factor masculino alterado. El seminograma únicamente tiene carácter diagnóstico.

Todos los análisis microscópicos de semen (seminograma o espermiograma) fueron realizados por el mismo biólogo (V.M.). Se realizaron 2 por paciente, el primero en el momento del diagnóstico de la alteración seminal y el segundo el día en que se efectuó la IAC o la ICSI.

Se siguieron los criterios descritos por la organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010. Nuestro laboratorio está acreditado por la Consejería de Sanidad de la Comunidad Autónoma de Murcia para realizar todas las técnicas de reproducción asistida. El laboratorio está validado por controles externos de calidad con la calificación de excelente.

Las muestras de semen fueron recogidas por masturbación después de 3-5 días de abstinencia sin eyacular. Se recogieron en un recipiente estándar de polipropileno. Una vez licuadas las muestras, se procedió al análisis espermático.

Las variables seminales que hemos tomado en consideración han sido: concentración espermática (M/ml), motilidad progresiva lineal (%) y REM (espermatozoides móviles recuperados en millones), pre y post-tratamiento.

Desarrollo de la técnica:

1. Transcurridos los 30 minutos para que se licue la muestra, se homogeniza con una pipeta automática valorando su viscosidad y licuefacción. Se calcula el pH con una tira de pH y se determina el volumen en un tubo de ensayo graduado.

2. Después, se procede a su análisis con la cámara Mackler®, poniendo una gota de muestra y calculando la concentración en millones por mililitro (M / ml). Se valora el movimiento, clasificándolo en A+B, C y D según criterios de la OMS 2010. Esta cámara está dividida en una cuadrícula de 10 x10 cuadritos, lo que facilita el recuento.

3. Posteriormente se realiza el test de vitalidad (eosina) y el análisis de la morfología (Kit Panóptico rápido).

Para hacer el test de vitalidad, se mezcla una gota de semen y eosina, se cubre y se cuenta con el objetivo de 40X campos al azar. El resultado de vitalidad se expresara en % de espermatozoides vivos.

Una vez que está seca la preparación de la morfología se realiza su tinción, utilizando la tinción de Panóptico-rápido:

- Alcohol para fijar la muestra
- Rojo eosina
- Azul de metileno
- Lavado en agua destilada, para quitar el exceso de colorante

Después, se evalúa la morfología con el objetivo de inmersión y aceite de inmersión (100x). Se cuentan en diferentes campos hasta llegar a 100 espermatozoides, evaluando espermatozoides normales y anormales. Dentro de éstos, diferenciaremos los que son anormales de cabeza, de pieza intermedia y de cola.

5.2. REM o CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

El proceso de capacitación consiste en realizar en el laboratorio todo aquello que ocurriría de forma natural dentro del aparato femenino, seleccionando los espermatozoides con movilidad progresiva (A+B), que serían los que de forma natural llegarían a la trompas de la mujer para fecundar el ovocito.

Existen diferentes técnicas para llevar a cabo dicha capacitación. En nuestro laboratorio de andrología utilizamos la técnica de los diferentes **gradientes de densidad** discontinuos, que nos va a permitir ir seleccionando los espermatozoides móviles. Utilizamos un gradiente de coloidal al 90% y 45% (PureSperm ,Nidacon®).

Al final de este proceso se obtiene el REM (recuento de espermatozoides móviles), que nos orientará a la hora de elegir el tipo de TRA a realizar. Con un valor por debajo de 5M, nos indicaría una recuperación muy pobre de espermatozoides móviles por lo que esa muestra iría directamente a ICSI (astenospermia severa). Con una REM mayor a 5 millones la desviaríamos a IAC (astenospermia leve).

Desarrollo de la técnica:

1. Se analiza la muestra en la cámara Mackler® para evaluar su movilidad y acordar la cantidad de gradiente que vamos a utilizar. La cantidad de gradiente oscila desde 0 ml a 1.5 ml, y depende de la concentración de la muestra y su movilidad inicial. En primer lugar, se trabaja con el gradiente de 90, después el de 45 y por último el semen.
2. Centrifugamos 25 minutos a 1400 rpm (centrífuga Unicen20). Una vez terminada la centrifugación, se obtienen en el fondo del tubo los espermatozoides tipo A + B que son los que nos interesan. Se rescatan utilizando una pipeta Pasteur® de vidrio, procediendo a su lavado con 2-5 ml de medio de cultivo en tubo limpio.
3. Se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm, para lavar la muestra. Después de centrifugar queda en el fondo del tubo la fracción de espermatozoides a recuperar.

4. Se separa el sobrenadante con una pipeta Pasteur®, quedando el pellet (espermatozoides A + B). Esta fracción se resuspende con medio Puresperm® y se calcula el REM con la cámara Mackler® contando aquellos con movilidad progresiva (A+B).

Para realizar las inseminaciones el resuspendido se cargará con:

- Cánula modelo Gynetics® para canalizaciones intrauterinas fáciles.
- Cánula modelo Wallace® para canalizaciones intrauterinas difíciles.

6. METODOLOGÍA DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA)

6.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CONYUGAL (IAC)

La inseminación artificial conyugal (IAC) consiste en el depósito instrumental de semen del cónyuge, procesado en el laboratorio con técnicas encaminadas a mejorar su calidad, en el aparato genital femenino, preferentemente en la cavidad uterina

6.1.1. Estudio previo

- Seminograma y recuperación de espermatozoides móviles (REM).
- Exploración ginecológica completa y ecografía transvaginal para recuento de folículos antrales entre el día 3 y 5 del ciclo.
- Confirmación de permeabilidad tubárica mediante histerosalpingografía (HSG).
- Determinaciones hormonales en el día 3º y 5º del ciclo.
- Serología de ambos cónyuges (RPR, HIV, Hepatitis B y C).

6.1.2. Protocolo de tratamiento

El proceso comienza con la estimulación ovárica. El objetivo sería alcanzar el desarrollo de 1-2 folículos maduros, siempre que no estén acompañados de una cohorte de folículos pequeños.

Las gonadotropinas constituyen el tratamiento de elección. Hemos utilizado siempre medicación FSH recombinante por su alta pureza, homogeneidad entre lotes y su trazabilidad.

La estimulación ovárica comenzó siempre entre el día 2-3 del ciclo natural. Previamente se comprobó el estado ovárico de normalidad mediante ecografía transvaginal. La dosis de inicio en el primer ciclo fue 50-75 UI/día, dosis estándar en mujeres normo-respondedoras.

El primer control ecográfico se realiza tras 4-5 días de tratamiento, momento en el que se ajusta la dosis de forma individual, así como los controles sucesivos. Cuando un folículo alcanza un diámetro igual o mayor a 16 mm, se desencadena la ovulación mediante administración subcutánea de 250 microgramos de hCG recombinante.

Si durante la estimulación se observa el desarrollo de cuatro ó más folículos, se cancela el ciclo.

La inseminación se realiza en la clínica de forma ambulatoria 36 horas tras la administración de hCG, ya que se trata de un procedimiento breve y completamente indoloro. Se expone el cuello del útero (de modo similar al empleado cuando se realiza una citología) y el ginecólogo introduce a través del cuello un catéter de inseminación (descrito previamente), depositando en el útero el pequeño volumen de líquido que contiene los espermatozoides seleccionados. Aconsejamos 4 horas de reposo en casa y vida normal.

A los 16 días de la inseminación, en ausencia de menstruación, se realiza una determinación plasmática de B-hCG. Si es superior a 50 mUI/ml confirmamos el llamado embarazo químico, citando a la paciente en la semana 7 para realizar una ecografía que visualice latido cardíaco, que confirmaría el llamado embarazo clínico.

6.2. FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV-ICSI)

6.2.1. Estudio previo

Toda paciente que se incorpora a un programa de FIV en nuestra unidad deberá haber pasado por un estudio exhaustivo de fertilidad que permita ajustar la indicación de la técnica, un despistaje de enfermedades infecciosas que podrían repercutir en la futura gestación y un consentimiento informado que deberá firmar tras comprensión del procedimiento al que va a someterse.

- Seminograma y recuperación de espermatozoides móviles (REM).
- Exploración ginecológica completa y ecografía transvaginal para recuento de folículos antrales entre el día 3 y 5 del ciclo.
- Determinaciones hormonales en el día 3º y 5º del ciclo.
- Serología de ambos cónyuges (RPR, HIV, Hepatitis B y C).
- Prueba de transferencia embrionaria.

6.2.2. Protocolo de tratamiento

▪ Elección del protocolo

En nuestra UR realizamos fundamentalmente dos tipos de protocolos de estimulación ovárica:

A. Análogos de la GnRH.

Los análogos de la GnRH han sido unos de los fármacos más usados en los protocolos para FIV por su acción inhibitoria sobre el pico endógeno de LH. Nosotros solemos utilizar el protocolo largo, en el cual, el fármaco se inicia en fase lútea del ciclo previo con la finalidad de inducir la desensibilización hipofisaria entre los 8 a 21 días posteriores, y por tanto evitar la luteinización precoz folicular durante la estimulación con gonadotropinas. El fármaco que utilizamos es la nafarelina intranasal (Synarel®).

B. Antagonistas de la GnRH.

Los antagonistas de la GnRH son moléculas que producen un efecto inmediato y directo de supresión hipofisaria. Los más usados son la cetorelina y la ganirelina. *Este protocolo es el que mayoritariamente se ha utilizado en los ciclos estudiados.*

Las ventajas son:

- Comodidad: dado que clásicamente se inicia su administración, ya sea en dosis única como diaria, hacia el final de la estimulación ovárica, cuando los folículos más grandes han llegado a 14 mm o el estradiol ha superado los 400-600 pg/dl.
- Efecto inmediato.

Cuando se comparan agonistas con antagonistas de la GnRH, no se encuentran diferencias significativas en la tasa de gestaciones múltiples, tasa de aborto, porcentaje de ciclos cancelados e incidencia de síndrome de hiperestimulación ovárica. Ambos tratamientos fueron igual de eficaces en la prevención del pico de LH precoz.

▪ **Estimulación ovárica**

El proceso comenzará con la estimulación ovárica. La tendencia actual a la hora de plantear una FIV-ICSI es la inducción de una ovulación múltiple controlada.

Las gonadotropinas son los fármacos más usados para la inducción del desarrollo folicular múltiple. Las más usadas actualmente son la Human menopausal gonadotrophin (HMG) y Follicle-Stimulating Hormone (FSH) recombinante (FSHr) o urinaria (FSHu).

Las gonadotropinas de origen recombinante son tan eficaces como las de origen urinario (no muestran diferencias significativas en el número y/o calidad de los ovocitos y embriones obtenidos ni en la tasa de implantación), aunque se recomienda el uso de las recombinante por su alta pureza, homogeneidad entre lotes y su trazabilidad.

En nuestro estudio hemos utilizado recombinantes en asociación con urinarias de alta pureza en la mayoría de los ciclos.

Se utilizó en más del 90% de los ciclos un protocolo de antagonistas del GnRH (Cetrotide® u Orgalutran®) y en el resto, un protocolo largo de agonistas del GnRH (Synarel®).

La estimulación ovárica se efectuó en un 90% de los ciclos con FSH recombinante (Puregon® o Gonal-F®) y en un 10% de los ciclos protocolo combo con FSH + LH (Puregon® o Gonal-F® + Menopur®).

La monitorización de la dinámica folicular fue realizada por exámenes ultrasónicos transvaginales, comenzando el día 5 de la administración de gonadotrofinas.

▪ **Maduración folicular con HCG**

La molécula de hCG (Ovitrelle®), se usa como tratamiento estandarizado para imitar el pico de LH e inducir la maduración folicular requerida para la recogida de ovocitos. Se ha utilizado en todos los ciclos.

6.2.3. Punción folicular

De forma casi universal, se ha adoptado la punción folicular transvaginal mediante guía ecográfica, como método más eficaz y seguro para la obtención de ovocitos en ciclos de FIV.

Se debe ofrecer a la paciente una técnica de analgesia efectiva, general con fármacos testados. La sedación intravenosa con Propofol®, con control de constantes y monitorización por un especialista, es la opción más comfortable para la paciente y para el equipo médico, y ha sido siempre la utilizada.

La punción folicular consiste en la recuperación de ovocitos mediante una pequeña intervención quirúrgica con sedación general donde el ginecólogo punciona por vía vaginal.

Nosotros empleamos una aguja de punción marca (Labotect®, Alemania) y con la ayuda de una ecógrafo modelo (Toshiba® Nemio XG, Japón). Se

puncionan todos los folículos existentes, recogiendo todos los líquidos foliculares en tubos Falcon®, donde van inmersos los ovocitos. La auxiliar de quirófano traslada estos tubos al laboratorio de embriología.

Antes de la punción se prepara una placa de captación ovocitaria (Placa Petri® 35mm) con medio de lavado (G-Mops, Vitrolife®, Suecia) para que se atempere.

6.2.4. Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) consiste en microinyectar un ovocito con la ayuda de una micropipeta para dejar un espermatozoide dentro con el fin de ayudar a la fecundación del ovocito.

Preparación de los ovocitos

Una vez se tienen los tubos Falcon con el líquido folicular, se vierten a una placa de captación (Placa Petri®) y se buscan visualmente los ovocitos, en cámara de flujo laminar, bajo un esteromicroscopio (Nikon® SMZ) a una luz tenue.

Todos los ovocitos recuperados se guardan en medio IVF (G-IVF Plus, Vitrolife®) dentro del incubador, hasta el momento de la denudación.

Denudación o decumulación:

Es necesaria para la observación del grado madurativo de los ovocitos y para la realización de la técnica de ICSI. Consiste en desprender las células de la granulosa que lo recubren y lo realizamos de dos formas: una química y otra mecánica.

Antes de denudar, se prepara una placa de cultivo con medio (G-Mops, Vitrolife®) y otra placa de denudación que contendrá, gotas de enzima Hialuronidasa (Hyase, Vitrolife®) y gotas de G-Mops, todo recubierto con aceite de parafina (Ovoil, Vitrolife®).

Material y Método

Para denudar los ovocitos, primero se dejan en las gotas de la enzima para que ésta actúe químicamente y se disgreguen las células de la granulosa.

Posteriormente, se van denudando de forma mecánica con Pipetas Pasteur® de diferentes calibres. Después se guardan en medio G-IVF hasta el momento de realizar la microinyección espermática intraovocitaria (ICSI).

Una vez denudados los ovocitos, se transfieren a una placa de Petri® para ICSI y se clasifican, con ayuda del microscopio invertido (Nikon® Elipse Ti), según su estado madurativo.

La maduración nuclear viene condicionada por la extrusión del primer corpúsculo polar. Sólo se microinyectarán aquellos ovocitos en metafase II, descartando los ovocitos en vesícula germinal y en Metafase I.

La placa de microinyección tendrá gotas de PVP (ICSI, Vitrolife®) (medio que contiene moléculas de polivinilpirrolidona que enlentecen el movimiento de los espermatozoides para poder inmovilizarlos más fácilmente), y gotas de medio G-Mops para dejar los ovocitos, recubierto todo de aceite OVOIL (Vitrolife®).

Metodología

La microinyección espermática consiste en inyectar un solo espermatozoide móvil, de morfología normal, una vez inmovilizado, en un ovocito en metafase II sin signos de degeneración.

Se ponen las agujas de microinyectar en los microinyectores, a un lado la de sujeción y a otro la de microinyectar, ICSI (Origio®, Dinamarca). Los ovocitos previamente decumulados y clasificados se sujetan con la aguja Holding (Origio®, Dinamarca), por aplicación de una ligera presión negativa que sujeta al ovocito a modo de ventosa.

Se realiza la ICSI, inmovilizando un espermatozoide de la gota de PVP donde se encuentra el semen capacitado y a continuación se microinyecta en el ovocito evitando la zona del corpúsculo polar.

Una vez microinyectados, se trasladan los ovocitos a una Placa de Petri® con medio de cultivo (G1-Plus, Vitrolife®), y los dejamos en el incubador a 37° C y

6% de CO₂, hasta comprobar que se produzca la fertilización en las próximas horas.

Esta placa se debe equilibrar previamente mínimo 8 horas en el incubador a las condiciones adecuadas. 17-19 horas después, sacamos la placa del incubador y valoramos al microscopio invertido (Nikon® Elipse Ti) si ha habido fecundación.

Valoramos la morfología de los embriones cada 24 horas, en el microscopio invertido durante 3-5 días, hasta que se realice la transferencia.

Valoración del desarrollo y calidad morfológica embrionaria

La valoración de la morfología embrionaria nos permite evaluar los diferentes parámetros morfológicos a diario con el fin de poder realizar una selección morfológica adecuada y decidir que embrión o embriones son los de mejor calidad para transferir. Esta valoración se realiza según los criterios establecidos por ASEBIR.

El chequeo de embriones se realiza desde el día que comprobamos fertilización (Día+1), hasta el día de la transferencia embrionaria, que realizamos mayoritariamente en Día+3, y algunos ciclos en Día+5. Se va anotando a diario en el formulario de FIV, los diferentes parámetros morfológicos que vamos observando de los diferentes embriones.

En *Día+1*, tenemos en cuenta en la fase de cigoto, los pronúcleos, precursores nucleolares, citoplasma y halo citoplasmático. Para una fecundación normal el ovocito debe tener 2 pronúcleos. Si existiera 1 pronúcleo o más de 2, se descartaría por presentar anomalías cromosómicas.

En *Día+2* y *Día+3* (fase de pre-embrión), valoramos entre otras características: las blastómeras (número, forma, tamaño...), el porcentaje de fragmentación, la multinucleación, y el grosor de la zona pelúcida.

ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) consideró necesario recoger en un documento de consenso aquellos

parámetros que debían considerarse para clasificar los embriones en diferentes estadios de desarrollo.

El trabajo realizado por la Comisión de ASEBIR quedó documentado en el II Cuaderno de Embriología Clínica, “Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos” (ASEBIR, 2008).

Desde hace más de tres décadas la valoración morfológica ha sido, el recurso más extendido y eficiente para el estudio de la calidad embrionaria. El principal problema radica precisamente en que al ser algo meramente observacional, sufre una alta subjetividad en base al “observador” que realice la valoración y los parámetros observados.

Se sigue la idea de clasificación embrionaria dinámica planteada desde el inicio por ASEBIR y por ello se considera el histórico de la evolución de los embriones en Día+2 (44-47 horas post inseminación) y Día+3 (67-71 horas post inseminación) para poder dar una gradación final al embrión de Día+4 (92+/-2 horas post inseminación).

Calidad de los preembriones:

Categoría A: Preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación:

- Preembrión que en Día+2 presenta 4 células y en Día+3, 7 ó 8 células
- Menos de un 10% de fragmentación
- Células iguales o semejantes
- Ausencia de vacuolas
- Ausencia de multinucleación

Categoría B: Preembrión de buena calidad con buena capacidad de implantación:

- Cualquier otra combinación siempre que suponga un incremento de 3-4 células de Día+2 a Día+3
- Hasta un 25% de fragmentación

Material y Método

- Células iguales o semejantes
- Ausencia de vacuolas
- Ausencia de multinucleación

Categoría C: Preembrión de regular calidad con una probabilidad de implantación media:

- Cualquier combinación siempre que suponga un Incremento de 1,2 ó 3 células de Día+2 a Día+3
- Hasta un 35% de fragmentación
- Células desiguales
- Ausencia de (o pocas) vacuolas
- Ausencia de multinucleación

Categoría D: Preembrión de mala con una probabilidad de implantación baja:

- Incremento de 1 única célula
- Hasta un 35% de fragmentación o Tipo IV
- Células desiguales
- Abundantes vacuolas
- Presencia de multinucleación

Cualquier otra combinación o en caso de que no haya incremento en el número de células de D+2 a D+3 se considera que es un embrión no viable.

La clasificación en **Día+4** es dinámica. Es una continuación de la clasificación morfológica en estadios celulares tempranos. Es de consenso que el embrión óptimo en Día+4 es el que está compactado o compactando y que ha iniciado la 4ª ronda de divisiones mitóticas (>8 células). La compactación debe comprender el total del volumen del embrión.

Posiblemente no haya por ahora ningún procedimiento de selección del mejor embrión totalmente valido por sí sólo, pero si se acaban de confirmar las expectativas puestas en la cinética embrionaria.

Los métodos de *time-lapse*, pueden ayudar a mejorar la selección embrionaria. En nuestro centro acabamos de incorporar el *sistema EEVA*, que ya acredita un aumento de la tasa de gestación del 10%, utilizando su sistema cinético de valoración embrionaria.

Los pacientes son informados a diario por teléfono, de la evolución de sus embriones.

El día de la transferencia se realiza, minutos antes de la transferencia, un contacto directo de los embriólogos con la pareja para hablar de la evolución de sus embriones y decidir el número final de embriones a transferir.

6.2.5. Transferencia embrionaria

Es el proceso por el cual introducimos el embrión o embriones en el útero de la mujer. Seleccionaremos de 1 a 2 embriones a transferir (máximo 3 embriones por Ley), según la decisión tomada por la pareja bajo el consejo del equipo.

Preparamos el día previo al transfer, las placas de transferencia. Una placa Nunc® con medio de cultivo G1-plus o G2-Plus (Vitrolife®) dependiendo del estadio en el que se encuentre el embrión (D+3/D+5). Una vez seleccionados los embriones a transferir, se sacan del incubador, se lavan con G-1/G-2 plus y se dejan en la placa transferencia Falcon® con medio EMBRYOGLUE (Vitrolife®).

El ginecólogo en la sala de transferencia junto a enfermería, prepara a la paciente que llega acompañada habitualmente por su pareja.

Se realiza una ecografía abdominal para verificar que acude en buenas condiciones de visibilidad para poder realizar la transferencia ecoguiada.

Se realiza un lavado con suero fisiológico del cuello uterino, y después se realiza otro lavado cervical pero con el mismo medio de cultivo embrionario.

Se prepara la cánula de transferencia (Labotect®, Suecia ó Wallace®, U.K), según la prueba de transferencia realizada previamente en la consulta. Una vez

cargados los embriones, el ginecólogo realiza la transferencia ecoguiada, y se espera de 10-15 segundos antes de retirar la cánula.

A continuación, se comprueba lavándola bajo el estereomicroscópico, que no haya quedado retenido ningún embrión.

6.2.6. Soporte farmacológico en fase lútea

Utilizamos siempre progesterona oleosa vaginal 600mgrs/día (200mgrs cada 8 horas), como apoyo de la fase lútea. Si la prueba de embarazo es positiva continúan con progesterona hasta la semana 10 de gestación.

7. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

7.1. Definiciones

Se define acontecimiento adverso, como todo acontecimiento que ocurra durante el estudio clínico, ya se trate de una enfermedad intercurrente o accidente, y altere el bienestar del enfermo.

El acontecimiento podrá adoptar también la forma de anomalía de laboratorio.

El término acontecimiento adverso no implica ninguna relación causal con el tratamiento del estudio. Todos los acontecimientos adversos, incluidas las enfermedades intercurrentes, serán notificados y documentados.

Los acontecimientos adversos serán divididos en las categorías de graves y no graves, que determinan el procedimiento a seguir para la notificación y documentación de los mismos.

❖ Acontecimientos adversos graves

Se define como acontecimiento adverso grave:

- Todo acontecimiento que cause la muerte o amenace la vida del enfermo.
- Todo acontecimiento que provoque una discapacidad permanente.
- Todo acontecimiento que requiera o prolongue la hospitalización.

- Todo acontecimiento que suponga cáncer, anomalías congénitas o sea consecuencia de una sobredosis (administración de una dosis mayor de la estipulada).

❖ ***Acontecimientos adversos no graves***

Los acontecimientos adversos que no pertenezcan a ninguna de las categorías citadas anteriormente se calificarán como no graves.

Clasificación de la gravedad y relación con el tratamiento.

Con independencia de que el acontecimiento adverso sea clasificado como grave o no grave, su intensidad será evaluada como leve, moderada o severa, de acuerdo con criterios exclusivamente médicos.

- *Leve*: No impide las actividades rutinarias.
- *Moderado*: Interfiere las actividades rutinarias.
- *Severo*: Imposibilita las actividades rutinarias.

Debe tenerse en cuenta que un acontecimiento adverso severo no necesariamente debe ser grave y que un acontecimiento adverso grave no siempre es, por definición, severo.

Relación con el tratamiento.

El clínico debe intentar explicar cada acontecimiento adverso y valorar su relación con el tratamiento de prueba (probable, posible, sin relación). Los criterios para establecer la relación entre las reacciones adversas clínicas y la medicación del estudio comprenden:

- *Probable*:

Se considera que el acontecimiento adverso guarda una probable relación con la medicación si reúne los tres criterios siguientes:

Material y Método

1. Existe una relación temporal razonable entre la administración del medicamento y el acontecimiento adverso.
2. Se cumplen cualquiera de los siguientes criterios:
 - El acontecimiento adverso es un ejemplo típico de reacción adversa al fármaco conocida, de tal manera que:
 - Si se continúa el tratamiento, persiste el acontecimiento adverso.
 - Si cesa la administración del fármaco, desaparece el acontecimiento adverso.
 - Si se produce una re-exposición, reaparece el acontecimiento adverso.
3. En caso de que exista otra explicación del acontecimiento adverso (vb. tratamiento concomitante, enfermedad intercurrente), esta explicación es menos probable como causa del acontecimiento adverso.

- *Possible:*

Se considera como reacción adversa posiblemente relacionada con la medicación, aquella que cumpla los dos criterios siguientes:

1. Existe una relación temporal razonable entre la administración del fármaco y el acontecimiento adverso.
2. No se cumple ninguno de los criterios establecidos en el punto 2 anterior (probable) o existe otra explicación alternativa más verosímil del acontecimiento adverso.

- *Sin relación:*

Se catalogará el acontecimiento adverso como hecho sin relación con la medicación cuando cumpla alguno de los siguientes requisitos:

1. No se observa una relación temporal razonable entre la administración del medicamento y el inicio de la reacción adversa.

2. No resulte plausible desde el punto de vista biológico la relación causal entre la medicación y el acontecimiento adverso.
3. Exista otra explicación alternativa más verosímil del acontecimiento adverso.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES

Los clínicos, embriólogos, enfermeros y todas las partes involucradas en este estudio, lo llevaron a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, las normas de Buena Práctica Clínica (BPC), las directrices de la ICH y las leyes y normativas aplicables.

8.1. Aspectos Éticos (Helsinki) y Marco Legal

El estudio se realizó en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki (Seúl, octubre 2008) y con las normas de Buena Práctica Clínica (BPC) emitidas por el grupo de trabajo sobre Eficacia de Sustancias Medicinales de la Comunidad Económica Europea (1990) y las Leyes y Reglamentos vigentes en España (Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero); Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996 y la Asamblea General Edimburgo, Escocia, Octubre 2000 y las Notas de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002 y la del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004.

El Marco Legal que recoge las normas éticas que guiaron este estudio es el siguiente:

- Normas de Buena Práctica Clínica (BPC).
- Directiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 4 de abril de 2001, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros, sobre la aplicación de buenas prácticas en la realización de estudios clínicos de medicamentos de uso humano.

Material y Método

- Directiva 2005/28/CE de la Comisión, de 8 de abril de 2005, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de las buenas prácticas clínicas respecto a los medicamentos de uso humano, así como los requisitos para autorizar la fabricación o importación de dichos productos.
- Convenio de Oviedo para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respeto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997, ratificado con su publicación en el BOE el 20 de octubre de 1999.
- Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Título III. (BOE núm178, de 27 de julio).
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.
Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos y estudios clínicos con medicamentos.
- Real Decreto 1344/2007, de 11 de octubre, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano. Capítulo V (BOE núm 262, de 1 de noviembre).
- Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de la buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano.
- Finalmente, otras normas que también son de aplicación en cuestiones de investigación biomédica son las siguientes:
 - Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal.
- Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal.

8.2. Confidencialidad

La información médica de cada uno de los pacientes obtenida a partir de este estudio, se considera confidencial y se prohíbe su difusión a terceras personas.

Esta información podrá facilitarse al médico del paciente o a cualquier otro personal médico responsable de su bienestar sólo después de que el paciente lo haya aprobado.

El clínico investigador no deberá revelar sin la debida justificación ninguna información confidencial sobre los pacientes que haya sido obtenida durante el desempeño de sus responsabilidades en el estudio clínico.

La información referente a la identidad de los pacientes será considerada confidencial a todos los efectos. La identidad de los pacientes no podrá ser desvelada ni divulgada.

La base de datos que genere el estudio no contendrá identificación alguna del paciente, más que un código numérico por el que no será posible desvelar su identidad. Dicha identidad quedará siempre entre la relación médico-paciente, y no podrá conseguirse sin el consentimiento de ambos.

Si, como excepción, por motivos legales o en caso de una auditoria para evaluar la calidad de los datos, fuese obligatorio el conocimiento de la identidad del paciente, el clínico investigador del estudio deberá mantener siempre las normas de confidencialidad. Para ello se seguirá lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de "Protección de Datos de Carácter Personal".

8.3. Responsabilidades del clínico

El clínico dirige y se responsabiliza de la realización práctica del estudio clínico en un centro. Solamente actuó como investigador un médico especialista en Medicina de la Reproducción, siguiendo las normas de Buena Práctica Clínica, y el Real Decreto 223/2004.

Entre las obligaciones y responsabilidades del investigador principal se encuentran:

- Estar de acuerdo con el protocolo del estudio.
- Conocer a fondo las propiedades de los medicamentos en estudio.
- Garantizar que el consentimiento informado se recoge de conformidad a lo establecido en este real decreto.
- Recoger, registrar y notificar los datos de forma correcta y garantizar su veracidad.
- Notificar inmediatamente los acontecimientos adversos graves o inesperados.
- Garantizar que todas las personas implicadas respetarán la confidencialidad de cualquier información acerca de los sujetos del ensayo, así como la protección de sus datos de carácter personal.

9. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los datos cumplimentados por el clínico-investigador, tan solo serán visibles por él mismo, y por la persona que lleve a cabo el análisis de los datos.

Nadie externo al clínico ni al estadístico, podrá realizar cambios. Todas las partes se comprometerán a guardar la máxima confidencialidad.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio, ha sido responsabilidad de un asesor estadístico externo, contratado a tal efecto por la Unidad de Reproducción. Concretamente, *Consultoría Estadística Murcia* (www.estadísticamurcia.com).

Material y Método

El estadístico responsable, se encargó de coordinar el análisis estadístico. Se redactó un plan de análisis estadístico (PAE) en el que constaban los detalles del análisis.

El PAE finalizó antes de que el cierre de la base de datos. Cualquier desviación del PAE se justificará en el informe del estudio clínico. Este estudio se ha llevado a cabo conforme a procedimientos de enmascaramiento interno, omitiendo datos identificativos de los pacientes.

Antes del inicio del análisis de los datos se realizó la validación de la base de datos por el clínico y los embriólogos, para asegurar la calidad de la misma, y una vez validada se realizó el cierre de ésta.

Análisis de los resultados

El tamaño de la muestra se ha establecido de forma que tenga una potencia del 80% para llegar a la conclusión de equivalencia entre ambas pautas de tratamiento y respecto al grupo control.

Para el análisis estadístico descriptivo de la muestra se emplearon los métodos descriptivos básicos, de modo que, para las variables cualitativas, se obtuvo el número de casos presentes en cada categoría y el porcentaje correspondiente. Para las variables cuantitativas, obtendremos los valores mínimo, máximo, media y desviación típica.

En las tablas de contingencia, obtenemos la frecuencia y el porcentaje de casos que presentan las dos características de forma conjunta. Para conocer si entre las dos variables hay o no dependencia hemos realizado la ***prueba Chi-cuadrado***. Se comprueba también si las proporciones de columna son o no diferentes.

Para la comparación de medias entre grupos se ha empleado el ***test ANOVA*** una vez comprobado los supuestos de normalidad con el ***test de Shapiro-Wilk*** ($n < 30$) ó ***Kolmogorov-Smirnov*** ($n > 30$) y el supuesto de homogeneidad con el ***test de Levene***.

Para contrastar si el cambio entre las medidas de las variables seminales en el tiempo (pretratamiento y postratamiento) depende del grupo de tratamiento, se han realizado los **análisis Modelo Lineal General (MLG)**:

ANOVA factorial mixto o ANOVA de medidas parcialmente repetidas y **ANCOVA** para el diseño mixto. El primer análisis nos permitirá estudiar el efecto que sobre las variables dependientes (variables seminales) ejercen los factores intra-sujeto (pre y post test) e intersujeto (grupo de tratamiento) y la interacción de éstos.

En el segundo análisis se controla de forma estadística el influjo que la variable días de tratamiento pueda ejercer en la relación de dichos factores (intra e inter).

El **Análisis Multivariante de la Varianza (MANCOVA)**, se realizó para determinar qué variables dependientes (variables embrionarias), tienen una relación significativa con la variable independiente, grupo de tratamiento, controlando de forma estadística el efecto que en las diferencias pueda ejercer el REM postratamiento, actuando este factor como covariable, utilizando para los contrastes multivariados el estadístico **Traza de Pillai**.

La comprobación de los supuestos para poder realizar el MANCOVA se ha realizado mediante: normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov, la homogeneidad univariante mediante el test de Levene, la prueba de homogeneidad de matrices de varianzas-covarianzas mediante el contraste M de Box y la correlación entre las variables mediante la Prueba de esfericidad de Bartlett.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 22.0 para Windows.

Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p < 0,05$.

10. DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL.

PRINCIPIOS ÉTICOS PARA LOS ESTUDIOS MÉDICOS EN SERES HUMANOS

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000 Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002 Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.

INTRODUCCION

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.
2. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.
3. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.
4. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.
5. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

6. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están sobre representadas en la investigación médica, deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.
7. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.
8. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.
9. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.
10. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.
11. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACION MÉDICA

1. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la

confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

2. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.
3. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.
4. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiadas.
5. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.

6. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.
7. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
8. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.
9. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.
10. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.
11. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.
12. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

13. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.
14. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.
15. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.
16. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

17. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.
18. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.
19. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.
20. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones

que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACIÓN MÉDICA SE COMBINA CON LA ATENCIÓN MÉDICA

1. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.
2. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias: el uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
3. Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.
4. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.
5. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.
6. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida,

Material y Método

restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

RESULTADOS

Los resultados se van a describir separando el material del estudio en dos grandes grupos según la TRA utilizada: IAC ó ICSI.

CAPÍTULO 1. ANTIOXIDANTES EN VARONES CON ASTENOSPERMIA IDIOPÁTIVA LEVE QUE PRECISAN DE IAC

Describimos los resultados obtenidos en varones subfértiles, con astenospermia idiopática leve, que precisan como TRA, IAC.

En la **Tabla 3** se describen, las edades medias del varón y mujer en los tres grupos de estudio, tiempo de esterilidad en meses, e IMC de la mujer.

Todos los varones estudiados tienen unas edades aproximadas de 35 ± 6 años. Se observa que *los tres grupos son homogéneos* no existiendo diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$).

También se describe, el número de ciclos de IAC y el número de parejas tratadas.

Hemos analizado *55 parejas estériles* con astenospermia idiopática leve, con una capacitación espermática (REM) igual o superior a 5 millones de espermatozoides:

29 parejas controles sin tratamiento antioxidante y 26 parejas cuyo varón fue tratado con antioxidantes (11 varones con antioxidante único y 15 varones con antioxidantes combinados).

El *número de ciclos totales de IAC realizados fue de 96*, 50 en controles y 46 con antioxidantes (18 con antioxidante único y 28 con antioxidantes combinados).

Todos los objetivos y sus resultados serán expresados por ciclo de tratamiento realizado y no por pareja tratada.

	Control	Antiox Único	Antiox. Combinados	p
Edad varón	35,89 ±4,3	35,80 ±6,6	35,60 ±4,8	0,983
Meses esterilidad	28,46 ±21,6	21,82 ±9,0	23,29 ±8,4	0,456
Edad mujer †	34,07 ±3,3	33,91 ±4,0	32,93 ±3,6	0,588
IMC †	22,37 ±4,7	21,87 ±3,0	21,17 ±3,0	0,681
Nº Ciclos (96)	50	18	28	
Nº parejas (55)	29	11	15	

†Los valores representa la media ± DT. Prueba ANOVA. Homogeneidad asumida: Prueba Levene $p < 0,05$ †Prueba Chi-cuadrado Pearson

Tabla 3. Características de las parejas estudiadas en IAC

1. PARÁMETROS SEMINALES

1.1. Verificación de homogeneidad entre grupos antes del tratamiento.

En la **Tabla 4** se muestran las comparaciones en los parámetros seminales, entre los pacientes de los tres grupos de estudio antes de iniciar el tratamiento.

Parámetro Seminal	Tratamiento (n ciclos)	Mín.	Máx.	Media (DT)	ET	ANOVA	
						F (g.l.)	p
CONCENTRACIÓN (M/ml)*	Control (50)	12	230	71,7 (44,6)	6,4	1,272 (2;92)	0,285
	Único (18)	12	132	47,9 (35,4)	8,3		
	Combinado (28)	7	300	72,6 (49,8)	9,4		
MOTILIDAD PG (%)*	Control (50)	15	31	23,9 (5,4)	0,8	2,390 (2;93)	0,097
	Único (18)	8	31	20,8 (6,3)	1,5		
	Combinado (28)	14	31	22,8 (6,0)	1,1		

*Prueba de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). DT: desviación típica. ET: error típico. g.l.: grados libertad.

Tabla 4. Comparación de los parámetros seminales entre grupos de estudio antes del tratamiento en parejas a las que se realizó IAC.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la variable **concentración** espermática [$F_{2,92}=1,272$; $p=0,285$] y tampoco en la variable **motilidad progresiva** espermática [$F_{2,92}=2,390$; $p=0,097$], entre los tres grupos de estudio.

Este estudio estadístico permite ofrecer garantías de que los resultados observados, son indicativos de que no hay sesgo en la randomización de los grupos, en relación a los parámetros seminales básicos del estudio (concentración y movilidad progresiva), antes de iniciar los tratamientos.

1.2. Valoración del efecto del tratamiento en los parámetros seminales.

En la **Tabla 5** y **Figura 13**, observamos los resultados estadísticos (MGL), para los parámetros seminales en los pacientes según el grupo de tratamiento asignado.

	MEDIDAS		EFECTO		
	Pre	Post	Tratamiento F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tratamiento*Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)
Variable (n)					
	Media (DT)	Media (DT)			
Concentración (10⁶/ml)			F[2,92]=1,211; p=0,302 (0,026)	F[1,92]=2,038; p=0,157 (0,022)	F[2,92]=0,084; p=0,919 (0,002)
Control (50)	71,65 (44,6)	60,00 (67,0)			
Único (18)	47,92 (35,4)	42,72 (54,7)			
Combinado (28)	72,61 (49,8)	61,82 (64,8)			
Total	67,44 (57,9)	57,26 (60,5)			
Motilidad PG (%)			F[2,93]=2,144; p=0,123 (0,044)	F[1,93]=34,682; p<0,001 (0,272)	F[2,93]=0,916; p=0,404 (0,019)
Control (50)	23,94 (4,4)	30,08 (7,7)			
Único (18)	20,78 (6,3)	26,44 (8,9)			
Combinado (28)	22,82 (6,0)	32,07 (7,7)			
Total	23,02 (5,4)	29,98 (7,9)			

Resultados

DT: desviación típica. g.l.: grados libertad. Prueba de homogeneidad de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). Eta^2 : eta cuadrado parcial (tamaño del efecto).

Tabla 5. MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales según tipo de tratamiento en ciclos de IAC.

- ❖ Con respecto a la **concentración** de espermatozoides, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,302$). por tanto, la concentración media de espermatozoides es la misma entre los grupos de tratamiento.

Para el efecto principal *tiempo (pre/pos)*, la prueba reveló que el efecto del factor tiempo no es significativo ($p=0,157$) y, en consecuencia, la concentración media de espermatozoides es la misma entre el pretratamiento y el postratamiento, independientemente de la participación en los grupos control o antioxidantes (único o combinado).

La *interacción de grupo y factor tiempo (pre /pos)*, tampoco resultó significativa ($p=0,919$).

- ❖ Para la valoración de la **motilidad**, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,123$), por tanto el porcentaje medio de motilidad es el mismo entre los tres grupos de tratamiento.

Para el *efecto principal tiempo (pre/pos)*, la prueba reveló que si es *significativo* ($p<0,001$) y, en consecuencia, que la motilidad no es la misma entre el pretratamiento y el postratamiento, independientemente de la participación en el grupo control, antioxidante único o combinado. El eta cuadrado de 0,272 (efecto moderado), nos indica que, el 27,2% de la varianza en la motilidad, está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente. El resultado de la comparación entre el pretratamiento y el postratamiento indica que *la motilidad aumentó significativamente* ($p<0,05$), pero la *interacción de grupo y tiempo no resultó significativa* ($p=0,404$).

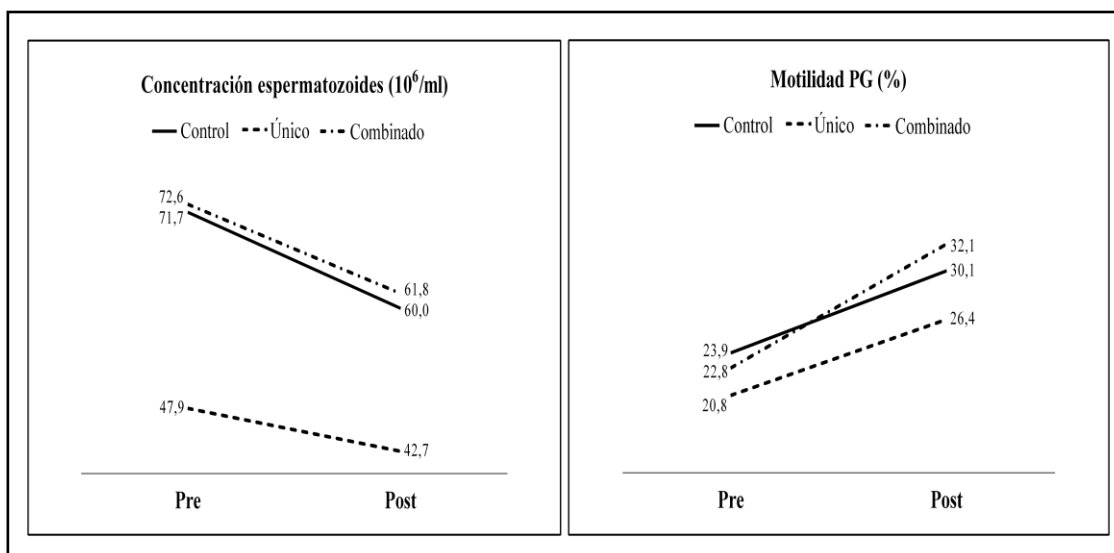


Figura 13. Efecto de los Tipos de Tratamiento en relación a los Parámetros Seminales Concentración y Motilidad.

1.3. Estudio comparativo del efecto del tratamiento único y combinado (head to head) en los parámetros seminales, controlando el efecto de dos variables: la duración del tratamiento en días y la edad del paciente.

Con este estudio, hemos intentado comprobar de forma estadística, el influjo que terceras variables, pueden ejercer en la relación entre el factor tiempo (pre y postratamiento) y la variable dependiente (tipo de tratamiento).

Para ello, aplicamos el análisis de covarianza, ANCOVA, donde disponemos de las variables cuantitativas, *días de tratamiento* y *edad del paciente*, que actúan como covariables.

- ❖ Para la **concentración** de espermatozoides, la interacción entre el factor *tiempo pre y pos* y las *covariables, días tratamiento* [$F_{1,41}=0,179$; $p=0,675$] y *edad* [$F_{1,41}=3,670$; $p=0,062$], no es significativa, por lo que:

(1) no hay una relación significativa entre los días de tratamiento y la diferencia temporal en la caída de la concentración de espermatozoides.

(2) no hay una relación significativa entre la edad del varón y la diferencia temporal en la caída de la concentración de espermatozoides.

Resultados

En la **Tabla 6** se observa que la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,218$), por tanto, la **concentración** media de espermatozoides es la misma entre los dos grupos de tratamiento.

	MEDIDAS		EFECTO		
	Pre	Post	Tratamiento F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tratamiento*Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)
Variable (n)					
	Media (DT)	Media (DT)			
Concentración (10⁶/ml)			F[1,44]=1,562; p=0,218 (0,034)	F[1,44]=1,587; p=0,214 (0,035)	F[1,44]=0,194; p=0,662 (0,004)
Único (18)	47,92 (35,4)	42,72 (24,7)			
Combinado (28)	72,61 (49,8)	61,82 (34,8)			
Total	62,95 (39,6)	54,35 (30,3)			
Motilidad PG (%)			F[1,44]=2,54; p=0,118 (0,055)	F[1,44]=13,202; p=0,001 (0,231)	F[1,44]=0,762; p=0,387 (0,017)
Único (18)	20,78 (6,3)	26,44 (8,9)			
Combinado (28)	22,82 (6,0)	32,07 (15,7)			
Total	22,02 (6,2)	29,87 (13,6)			

DT: desviación típica. g.l.: grados libertad. Prueba de homogeneidad de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). Eta²: eta cuadrado parcial (tamaño del efecto)

Tabla 6. MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales entre tratamientos único y combinado (head to head) en ciclos de IAC.

Para el efecto principal tiempo, la prueba reveló que el efecto del factor *tiempo (pre/post)*, no es significativo ($p=0,214$) y, en consecuencia, la **concentración** media de espermatozoides es la misma entre el pre test y el post test, independientemente de la participación en el grupo de tratamiento único o combinado. La interacción de *grupo y tiempo* tampoco resultó significativa ($p=0,662$).

❖ Para **motilidad**, la interacción entre el factor tiempo y las covariables *días tratamiento* [$F_{1,41}=0,541$; $p=0,466$] y *edad del varón* [$F_{1,41}=0,446$; $p=0,508$], no es significativa, por lo que:

(1) no hay una relación significativa entre los días de tratamiento y la diferencia temporal en el porcentaje de motilidad.

(2) no hay una relación significativa entre la edad y la diferencia temporal en el porcentaje de motilidad.

Según los resultados mostrados en la **Tabla 6 y Figura 14**, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,118$), por tanto el porcentaje de **motilidad progresiva** medio, es el mismo entre los grupos de tratamiento.

Para el efecto principal *tiempo (pre y pos)*, la prueba reveló que el efecto del factor *tiempo* es significativo ($p<0,001$) y, en consecuencia, que la motilidad no es la misma entre el pre test y el post test, independientemente de la participación en el grupo de tratamiento. El eta cuadrado de 0,231 (efecto moderado), nos indica que el 23,1% de la varianza en la motilidad está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente.

*El resultado de la comparación entre el pre y el postratamiento indica que la **motilidad** aumentó significativamente ($p<0,05$) del pretratamiento al postratamiento: grupo único (pre 20.78% y pos 26.44%, incremento 5.66%), grupo combinados (pre 22.82% y pos 32.07%, incremento 9.25%). La interacción de grupo y tiempo no resultó significativa ($p=0,387$).*

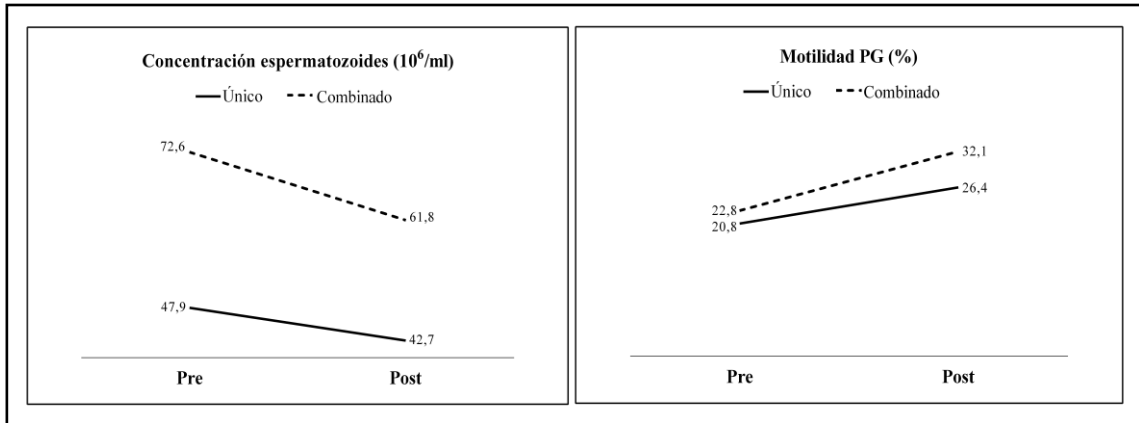


Figura 14. Efecto del tipo de tratamiento único y combinado en relación a los parámetros seminales.

2. PARAMETROS GESTACIONALES. TASAS DE EMBARAZO.

En la **Tabla 7** se describen las tasas de embarazo por ciclo de tratamiento realizado, clasificándolas en:

tasa de embarazo bioquímico, clínico, viable, a término y de recién nacido vivo sano, en los grupos control y tratamiento con *antioxidantes en general*, en parejas a las que se ha realizado IAC.

		Control	Antioxidantes	p*
EMB. BIOQUÍMICO	No	41 (82,4)	30 (65,2)	0,04
	Sí	9 (17,6)	16 (34,8)	
	Total ciclos	50 (100)	46 (100)	
EMB. CLÍNICO	No	43 (86,3)	35 (76,1)	0,19
	Sí	7 (13,7)	11 (23,9)	
	Total ciclos	50 (100)	46 (100)	
EMB. VIABLE	No	43 (86,3)	36 (78,3)	0,30
	Sí	7 (13,7)	10 (21,7)	
	Total ciclos	50 (100)	46 (100)	
EMB. TÉRMINO	No	43 (86,3)	37 (80,4)	0,43
	Sí	7 (13,7)	9 (19,6)	
	Total ciclos	50 (100)	46 (100)	
RNVS	No	43 (86,3)	37 (80,4)	0,43
	Sí	7 (13,7)	9 (19,6)	
	Total ciclos	50 (100)	46 (100)	

RNVS: recién nacido vivo sano. p* (Chi-cuadrado).

Tabla 7. Tasas Embarazo/ciclo en grupo Control y Antioxidantes en ciclos IAC.

Se observa que, la *tasa de embarazo/ciclo bioquímico*, para el grupo *antioxidantes en general* fue de **34,8%**, frente al **17,6%** en el grupo *control*, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En el resto de tasas de embarazo/ciclo, (clínico, viable, a término y recién nacido vivo sano), siempre fueron **superiores en el grupo *antioxidantes*** respecto al control, pero sin observar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Concretamente, la *tasa de embarazo/ciclo de IAC con recién nacido vivo sano (RNVS)*, fue superior en el grupo *antioxidantes (19,6%)* respecto al grupo *control (13,7%)* pero no significativo ($p = 0,43$).

En la **Tabla 8**, observamos las tasas de embarazo/ciclo de tratamiento realizado clasificándolas en: embarazo bioquímico, clínico, viable, a término y

Resultados

de recién nacido vivo sano, en los grupos control y antioxidantes, pero *diferenciando según el tipo de antioxidante empleado (único o combinados)(head to head)*, en parejas a las que se les ha realizado IAC.

		CONTROL	ANTIOX ÚNICO	ANTIOX COMBINADOS	p*
EMB. BIOQUÍMICO	No	4 (82,4)	14 (77,8)	16 (57,1)	0,04*
	Sí	9 (17,6)	4 (22,2)	12 (42,9)	
	N ciclos (%)	50 (100)	18 (100)	28 (100)	
EMB. CLÍNICO	No	43 (86,3)	15 (83,3)	20 (71,4)	0,26
	Sí	7 (13,7)	3 (16,7)	8 (28,6)	
	N ciclos (%)	50 (100)	18 (100)	28 (100)	
EMB. VIABLE	No	4 (86,3)	15 (83,3)	21 (75,0)	0,44
	Sí	7 (13,7)	3 (16,7)	7 (25,0)	
	N ciclos (%)	50 (100)	18 (100)	28 (100)	
EMB. TÉRMINO	No	4 (86,3)	15 (83,3)	22 (78,6)	0,67
	Sí	7 (13,7)	3 (16,7)	6 (21,4)	
	N ciclos (%)	50 (100)	18 (100)	28 (100)	
RNVS	No	4 (86,3)	16 (88,9)	21 (75,0)	0,34
	Sí	7 (13,7)	2 (11,1)	7 (25,0)	
	N ciclos (%)	50 (100)	18 (100)	28 (100)	

p*: indica diferencias significativas entre las tres columnas a nivel 0,05 (Bonferroni). RNVS: recién nacido vivo sano.

Tabla 8. Tasas Embarazo/ciclo entre grupos Control y Tipo de Antioxidantes en ciclos IAC.

Hemos observado que *la tasa de embarazo por ciclo bioquímico, en el grupo de antioxidantes combinados fue del 42,9%, frente al 22,2% en pacientes con antioxidante único, y del 17,6% para el grupo control, (la prueba Chi-cuadrado*

evidencia que la tasa de embarazo por ciclo depende significativamente del grupo de tratamiento. ($\chi^2_2=6,151;p=0,046$)

*La tasa de embarazo/ciclo bioquímico tras IAC, de los pacientes con tratamiento de **antioxidantes combinados**, es significativamente superior respecto al resto de grupos de estudio.*

En el resto de tasas de embarazo evaluadas y de RNVS, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tipo de antioxidante utilizado ($p>0,05$), *aunque hay que mencionar que en el grupo de **antioxidantes combinados**, las tasas de embarazo clínico, viable, a término y RNVS, **fueron siempre las más elevadas**, comparando con control y con antioxidante único (head to head).*

Concretamente, *la tasa de embarazo/ciclo de IAC con recién nacido vivo sano (RNVS), fue superior en el grupo antioxidantes combinados (**25,0%**) respecto al grupo antioxidante único (**11,1%**) y al control (**13,7%**), aunque no estadísticamente significativo ($p=0,34$).*

CAPÍTULO 2. ANTIOXIDANTES EN VARONES CON ASTENOSPERMIA IDIOPÁTICA SEVERA QUE PRECISAN DE ICSI

En la **Tabla 9** se describen las características de las parejas que fueron reclutadas para realizar ICSI. Tanto la edad de ambos miembros de la pareja como el tiempo de esterilidad y el IMC de la mujer, fueron similares, siendo por tanto, *todos los grupos homogéneos*, para ser analizados.

	Control	Antiox. Único	Antiox. Combinados	p*
Edad varón	38,33 ±5,7	35,53 ±4,6	36,07 ±4,5	0,055
Meses esterilidad	33,94 ±25,5	27,53 ±15,1	26,38 ±11,0	0,200
Edad mujer †	34,97 ±4,0	34,65 ±2,9	34,63 ±3,1	0,876
IMC †	24,16 ±4,0	23,09 ±2,8	23,01 ±3,2	0,319
Nº Ciclos (161)	78	40	43	
Nº Parejas (124)	63	34	27	

†Los valores representa la media ± DT. Prueba ANOVA. Homogeneidad asumida: Prueba Levene p<0,05 †Prueba Chi-cuadrado Pearson.

Tabla 9. Características de las parejas estudiadas en ICSI

Se han estudiado *161 ciclos de tratamiento de ICSI* contando todos los grupos de estudio, *en 124 parejas* cuya única causa de esterilidad era “astenospermia idiopática severa”, con una capacitación espermática (REM) inferior a 5 millones de espermatozoides.

Todos los objetivos y sus resultados serán expresados por ciclo de ICSI realizado y no por pareja tratada.

1. PARAMETROS SEMINALES

1.1. Verificación de homogeneidad entre grupos antes del tratamiento

En la **Tabla 10** se describen los *parámetros seminales pretratamiento*, analizados en el estudio (concentración y motilidad progresiva), según el grupo de tratamiento asignado en la randomización (control, antioxidante único, o antioxidantes combinados).

Parámetro Seminal	Tratamiento (n ciclos)	Mín.	Máx.	Media (DT)	ANOVA			
					F	p	g.l.	
CONCENTRACIÓN (10 ⁶ /ml)*	Control (78)	1	595	54,7 (39,6)	4,5	4,369 2,156	0,014	
	Único (41)	0	110	23,2 (26,4)				
	Combinado (43)	0,3	300	28,3 (48,6)				
MOTILIDAD (%)*	PG	Control (78)	2	31	18,8 (7,6)	0,9	2,146 2,158	0,120
		Único (41)	0	31	17,3 (8,1)			
		Combinado (43)	2	31	15,6 (9,0)			

*Prueba de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). DT: desviación típica. ET: error típico. g.l.: grados libertad.

Tabla 10. Comparación Parámetros Seminales Pretratamiento según Grupos de Estudio en pacientes ICSI.

- ❖ En cuanto al parámetro **concentración**, tras realizar la prueba ANOVA, se observan diferencias estadísticamente significativas [$F_{2,156}=4,369$; $p=0,014$], en el sentido de que partimos de una concentración media mayor de espermatozoides en el grupo control respecto a ambos antioxidantes. Esto se explica porque, *el criterio seminal único de inclusión de pacientes, fue la astenospermia idiopática, concepto que afecta solo a la baja movilidad, y nos fue indiferente el parámetro*

concentración como criterio de inclusión, y ha dado la casualidad de que, en el grupo control había varones con mayor concentración de espermatozoides en el eyaculado, que en los grupos tratados con antioxidantes. Este criterio no lo hemos considerado consistente en los objetivos del estudio.

- ❖ Respecto a la **motilidad**, no se observan diferencias significativas en la niveles pretratamiento entre los tres grupos de estudio [$F_{1,158}=2,146$; $p=0,120$]. Este estudio de homogenización pretratamiento, permite ofrecer garantías estadísticas de que en los resultados que se encuentren al finalizar el estudio, no hay sesgo en la formación de los grupos, en relación a las variables de resultado antes del tratamiento.

1.2. Valoración efecto del tratamiento en los parámetros seminales

En la **Tabla 11** se observa que, respecto a la **concentración** espermática, la prueba mostró un *resultado significativo para el efecto principal tipo de tratamiento* ($p=0,006$), de efecto pequeño, (eta cuadrado de 0,065), por lo que *la concentración media de espermatozoides no es la misma entre los tres tipos de tratamiento*.

Resultados

	MEDIDAS		EFECTO		
	Pre	Post	Tratamiento F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tratamiento*Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)
Variable (n)					
	Media (DT)	Media (DT)			
Concentración (10⁶/ml)			F[2,153]=5,354; p=0,006 (0,065)	F[1,153]=4,595; p=0,034 (0,029)	F[2,153]=2,194; p=0,115 (0,028)
Control (78)	55,84 (39,6)	37,08 (33,7)			
Único (41)	23,15 (26,4)	22,29 (20,4)			
Combinado (43)	28,29 (48,6)	22,76 (27,3)			
Total	39,86 (63,9)	29,34 (29,8)			
Motilidad PG (%)			F[2,155]=2,777; p=0,065 (0,035)	F[1,155]=29,663;p <0,001 (0,161)	F[2,155]=0,344; p=0,710 (0,004)
Control (78)	18,84 (7,6)	27,24 (19,0)			
Único (41)	17,30 (8,1)	24,93 (14,1)			
Combinado (43)	15,63 (9,0)	21,47 (12,4)			
Total	17,58 (8,2)	25,08 (16,3)			

DT: desviación típica. g.l.: grados libertad. Prueba de homogeneidad de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). Eta²: eta cuadrado parcial (tamaño del efecto).

Tabla 11. MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos entre grupos en los parámetros seminales en ICSI.

De hecho, el grupo control presenta niveles significativamente superiores respecto a los pacientes con tratamientos único o combinado. Entre los pacientes con tratamiento único y combinado, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Para el efecto principal tiempo (pre/post), la prueba reveló que el efecto del factor tiempo es significativo ($p=0,034$) y, en consecuencia, que la concentración media de espermatozoides no es la misma entre el pretratamiento y el postratamiento, independientemente de la participación en el grupo control, único o combinado. **(Figura 16)**. El eta cuadrado de 0,029, efecto pequeño, nos indica que tan solo el 2,9% de la varianza en la concentración de espermatozoides está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente. El resultado de la comparación entre el pre y el

Resultados

post indica que *la concentración disminuyó significativamente del pretratamiento al postratamiento ($p < 0,05$)*, siendo la mayor disminución en el grupo control (caída de 18.76 M de media, y en el único sólo de 0.86 M y en el combinado de 5.53 M). La *interacción de tipo de tratamiento y tiempo* no resultó significativa ($p = 0,115$).

Respecto a la **motilidad**, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p = 0,065$), por tanto el porcentaje medio de motilidad es el mismo entre los tres grupos de tratamiento. **(Figura 15).**

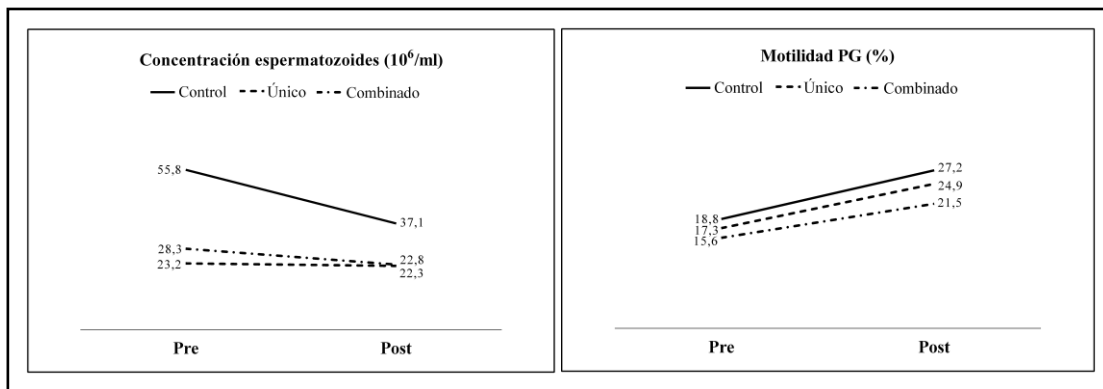


Figura 15. Efecto de los Tipos de Tratamiento en relación a los Parámetros Seminales en ciclos de ICSI.

Para el efecto principal *tiempo (pre/post)*, la prueba reveló que *el efecto del factor tiempo es significativo ($p < 0,001$) y, en consecuencia, que la motilidad no es la misma entre el pretratamiento y el postratamiento, independientemente de la participación en el grupo control, único o combinados.* El grupo control incrementó la motilidad un **8.4%**, seguido por antioxidante único, un **7.6%**, y el combinado un **4.8%**.

El eta cuadrado de 0,161, efecto moderado, nos indica que el 16,1% de la varianza en la motilidad está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente. El resultado de la comparación entre el pre y el post indica que *la motilidad aumentó significativamente del pre test al pos test ($p < 0,05$)*. La *interacción de tipo de tratamiento y tiempo* no resultó significativa ($p = 0,710$).

1.3. Valoración del efecto del tratamiento único y combinado (head to head) en los parámetros seminales controlando el efecto de la duración del tratamiento en días y la edad del paciente.

En la **Tabla 12** se expresa como controlar de forma estadística, el influjo que terceras variables pueden ejercer en la relación entre el factor tiempo (pre/postratamiento) y la variable dependiente (tipo de tratamiento).

Para realizar este estudio estadístico, aplicamos el análisis de covarianza, ANCOVA, donde disponemos de las variables cuantitativas, *duración del tratamiento en días y la edad del paciente*, que actúan como covariables.

	MEDIDAS		EFECTO		
	Pre	Post	Tratamiento F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)	Tratamiento*Tiempo F[g.l.];p-valor (eta ²)
Variable (n)					
	Media (DT)	Media (DT)			
Concentración (10⁶/ml)			F[1,78]=0,006; p=0,940 (0,000)	F[1,78]=10,285; p=0,002 (0,116)	F[1,78]=0,152; p=0,698 (0,002)
Único (41)	25,22 (26,9)	23,17 (20,6)			
Combinado (43)	26,92 (48,6)	22,43 (27,3)			
Total	26,07 (39,8)	22,80 (24,3)			
Motilidad PG (%)			F[1,81]=1,657; p=0,202 (0,020)	F[1,81]=22,462; p<0,001 (0,217)	F[1,81]=0,395; p=0,531 (0,005)
Único (41)	17,30 (8,1)	24,93 (14,1)			
Combinado (43)	15,63 (9,0)	21,47 (12,4)			
Total	16,43 (8,6)	23,13 (13,3)			

DT: desviación típica. g.l.: grados libertad. Prueba de homogeneidad de Levene: homogeneidad asumida ($p > 0,05$). Eta²: eta cuadrado parcial (tamaño del efecto).

Tabla 12. MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales según tratamientos único y combinado en ciclos de ICSI.

Para la **concentración** de espermatozoides la interacción entre el factor tiempo y los días de tratamiento no es significativa [$F_{1,75}=3,105$; $p=0,082$] por lo que no hay una relación significativa entre los días de tratamiento y la diferencia temporal en la concentración de espermatozoides.

La interacción entre el factor tiempo y la edad resultó significativa [$F_{1,75}=13,118$; $p=0,001$] por lo que hay una relación significativa entre la edad y la diferencia temporal en la concentración de espermatozoides. Según los resultados mostrados en la Tabla 12, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,940$), por tanto la concentración media de espermatozoides es la misma entre los grupos de tratamiento.

Para el efecto principal *tiempo*, la prueba reveló que el efecto del factor tiempo es significativo ($p=0,002$) y, en consecuencia *la concentración media de espermatozoides es significativamente superior en el pretratamiento respecto al postratamiento, independientemente de la participación en el tipo de tratamiento único o combinado*. El eta cuadrado de 0,116, efecto moderado, nos indica que el 11,6% de la varianza en la concentración de espermatozoides está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente. La interacción de grupo y tiempo no resultó significativa ($p=0,698$).

Respecto a la **motilidad**, la interacción entre el factor tiempo y los días de tratamiento no es significativa [$F_{1,75}=0,177$; $p=0,675$], por lo que no hay una relación significativa entre los días de tratamiento y la diferencia temporal en motilidad, así como la interacción entre el factor tiempo y la edad [$F_{1,75}=0,001$; $p=0,975$], por lo que no hay una relación significativa entre la edad y la diferencia temporal en motilidad.

Según los resultados mostrados en la **Tabla 12 y Figura 16**, la prueba no mostró un resultado significativo para el efecto principal *tipo de tratamiento* ($p=0,202$), por tanto el porcentaje de motilidad medio es el mismo entre los grupos de tratamiento. Para el efecto principal *tiempo (pre/post)*, la prueba reveló que el efecto del factor tiempo es significativo ($p<0,001$) y, en consecuencia, *que la motilidad no es la misma entre el pre test y el post test*,

independientemente de la participación en el grupo de tratamiento. El eta cuadrado de 0,217, efecto moderado, nos indica que el 21,7% de la varianza en la motilidad está asociada con el tiempo transcurrido de una medida para la siguiente. El resultado de la comparación entre el pre y el post indica que la motilidad aumentó significativamente del pretratamiento al postratamiento ($p < 0,05$): incremento de un 7.6% con antioxidante único y un 4.8% con combinados. La interacción del tipo de tratamiento y tiempo no resultó significativa ($p = 0,531$).

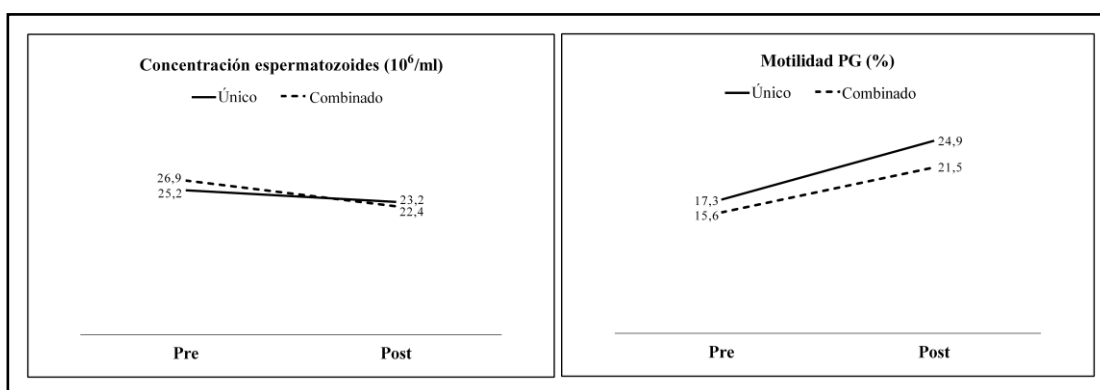


Figura 16. Efecto grupos de tratamiento único y combinado en relación a las parámetros seminales en ciclos de ICSI.

2. PARAMETROS OVOCITARIOS Y EMBRIONARIOS

En la **Tabla 13** se describen globalmente los parámetros ovocitarios y embrionarios, sumando todos los ciclos realizados de ICSI en todos los grupos de estudio.

Como datos medios más destacables por ciclo de ICSI:

se obtuvieron tras punción 7.33 ovocitos metafase II, dando lugar tras ICSI a 4.89 embriones.

La tasa media de fertilización fue de 68.36%, y transferimos una media de 71.92% de todos los embriones.

Resultados

La calidad embrionaria según criterios ASEBIR el día de la transferencia fue: A 23.0%, B 40.9%, C 28.5% y D tan sólo un 6.8%.

Parámetro	Mín.	Máx.	Media (DT) *
NºOvocitos aspirados	2	26	9,42 (5,2)
Nº Ovocitos MII	2	19	7,33 (4,1)
Nº Embriones	1	14	4,89 (3,0)
% Fertilización	16,6	100	68,36 (22,1)
% Embriones transferidos D3/D5	16,6	100	71,92 (25,3)
% Embriones calidad A día TE	0	100	23,03 (29,7)
% Embriones calidad B día TE	0	100	40,90 (33,3)
% Embriones calidad C día TE	0	100	28,51 (36,3)
% Embriones calidad D día TE	0	100	6,86 (18,6)
% Implantación	0	100	20,93 (29,1)

*Media (DT): Media + DT en número y % obtenida en los 162 ciclos de ICSI estudiados.

Tabla 13. *Parámetros ovocitarios y embrionarios en todos los grupos: control y antioxidantes.*

En la **Tabla 14** se describen los parámetros de laboratorio ovocitarios y embrionarios según grupo control de no tratamiento y grupos de antioxidantes único y combinados.

No hubo diferencias significativas entre grupos de estudio ($p > 0.05$), en ninguno de los parámetros de laboratorio evaluados:

- número de ovocitos aspirados
- número de ovocitos MII
- número de embriones obtenidos

Resultados

- número de embriones transferidos

- % calidad embrionaria

-% fertilización

-% de implantación

Estos resultados permiten validar el estudio comparativo posterior entre grupos, cuando analicemos los resultados gestacionales, ya que los tres grupos son desde su inicio, homogéneos.

Resultados

Parámetro	Tratamiento (n ciclos)	Mín.	Máx.	Media (DT)	p
Nº Ovocitos aspirados [†]	Control (78)	2	26	7,87 (4,5)	0,089
	Único (40)	2	20	8,93 (4,6)	
	Combinado (43)	2	26	9,88 (5,7)	
Nº Ovocitos MII [†]	Control (78)	1	25	6,13 (4,0)	0,178
	Único (40)	2	19	7,33 (4,3)	
	Combinado (43)	2	18	7,33 (3,9)	
Nº Embriones [†]	Control (78)	1	17	4,15 (2,9)	0,272
	Único (40)	1	12	5,03 (3,0)	
	Combinado (43)	1	14	4,77 (3,0)	
% Embriones transferidos D3/D5 [†]	Control (78)	25	100	74,75 (24,3)	0,200
	Único (40)	16,6	100	67,29 (27,1)	
	Combinado (43)	33,3	100	76,23 (22,9)	
% Embriones calidad A día transferencia [†]	Control (78)	0	100	29,97 (39,5)	0,366
	Único (40)	0	100	25,64 (33,2)	
	Combinado (43)	0	100	20,54 (26,2)	
% Embriones calidad B día transferencia [†]	Control (78)	0	100	41,84 (37,6)	0,707
	Único (40)	0	100	37,61 (34,3)	
	Combinado (43)	0	100	43,96 (32,3)	
% Embriones calidad C día transferencia [†]	Control (78)	0	100	21,24 (32,3)	0,381
	Único (40)	0	100	30,08 (35,6)	
	Combinado (43)	0	100	27,05 (37,3)	
% Embriones calidad D día transferencia [†]	Control (78)	0	100	5,50 (20,1)	0,824
	Único (40)	0	50	5,90 (15,0)	
	Combinado (43)	0	100	7,75 (21,6)	
% Fertilización [†]	Control (78)	16,66	100	69,30 (21,7)	0,680
	Único (40)	16,6	100	70,44 (21,0)	
	Combinado (43)	16,6	100	66,42 (23,1)	
% Implantación [†] (solo embarazo clínico)	Control (17)	33,3	100	57,84 (20,5)	0,886
	Único (12)	0	100	54,17 (25,7)	
	Combinado (10)	33,3	100	58,3 (22,57)	

[†]Prueba ANOVA. Homogeneidad asumida: Prueba Levene $p < 0,05$. Homogeneidad asumida: Prueba Levene $p < 0,05$

Tabla 14. Parámetros ovocitarios y embrionarios según grupos de estudio: control y antioxidantes, único y combinados.

3. PARÁMETROS GESTACIONALES. TASAS DE EMBARAZO

En la **Tabla 15** se describen las tasas de embarazo/ciclo transferido, bioquímico, clínico, viable, a término, y de recién nacido vivo sano, en los grupos de estudio, control y tratamiento con antioxidantes, en parejas a las que se les realizó ICSI.

Se observa que, la **tasa de embarazo bioquímico** para el grupo antioxidantes fue del **39,8%**, frente al **23,1%** en el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.023$). Al comparar el resto de tasas de embarazo (clínico, viable, a término y RNVS), siempre fueron superiores en parejas cuyo varón tomaba antioxidantes, pero sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Así la **tasa de RNVS** con antioxidantes fue del **26.5%** superior al control (**20.5%**) (NS).

		CONTROL	ANTIOXIDANTES	p*
EMB. BIOQUÍMICO	No	60 (76,9)	50 (60,2)	0,023
	Sí	18 (23,1)	33 (39,8)	
	Total ciclos	78 (100)	83 (100)	
EMB. CLÍNICO	No	61 (78,2)	61 (73,5)	0,486
	Sí	17 (21,8)	22 (26,5)	
	Total ciclos	78 (100)	83 (100)	
EMB. VIABLE	No	62 (79,5)	61 (73,5)	0,371
	Sí	16 (20,5)	22 (26,5)	
	Total ciclos	78 (100)	83 (100)	
EMB. A TÉRMINO	No	62 (79,5)	61 (73,5)	0,371
	Sí	16 (20,5)	22 (26,5)	
	Total ciclos	78 (100)	83 (100)	
RNVS	No	62 (79,5)	61 (73,5)	0,371
	Sí	16 (20,5)	22 (26,5)	
	Total ciclos	78 (100)	83 (100)	

p*: Chi-cuadrado

Tabla 15. Tasas Embarazo/ciclo en grupos Control y Antioxidantes en ICSI.

Resultados

En la **Tabla 16** se describen las *tasas de embarazo según tipo de antioxidante* y comparando con control.

La tasa de **embarazo bioquímico**, tanto en el grupo antioxidante único (**37,5%**), como combinados (**41,9%**), fue superior al grupo control (**23,1%**), y *esta diferencia es significativa* ($p= 0.05$).

La mayor **tasa de RNVS** se obtuvo con antioxidante único (**30.0%**), seguida de combinados (**23.3%**) y grupo control (**20.5%**), siendo estas diferencias NS.

		CONTROL	ANTIOX. ÚNICO	ANTIOX. COMBINADOS	p*
EMB. BIOQUÍMICO	No	60 (76,9)	25 (62,5)	25 (58,1)	0,05
	Sí	18 (23,1)	15 (37,5)	18 (41,9)	
	Total ciclos	78 (100,0)	40 (100,0)	43 (100,0)	
EMB. CLÍNICO	No	61 (78,2)	28 (70,0)	33 (76,7)	0,60
	Sí	17 (21,8)	12 (30,0)	10 (23,3)	
	Total ciclos	78 (100,0)	40 (100,0)	43 (100,0)	
EMB. VIABLE	No	62 (79,5)	28 (70,0)	33 (76,7)	0,51
	Sí	16 (20,5)	12 (30,0)	10 (23,3)	
	Total ciclos	78 (100,0)	40 (100,0)	43 (100,0)	
EMB. A TÉRMINO	No	62 (79,5)	28 (70,0)	33 (76,7)	0,51
	Sí	16 (20,5)	12 (30,0)	10 (23,3)	
	Total ciclos	78 (100,0)	40 (100,0)	43 (100,0)	
RNVS	No	62 (79,5)	28 (70,0)	33 (76,7)	0,51
	Sí	16 (20,5)	12 (30,0)	10 (23,3)	
	Total ciclos	78 (100,0)	40 (100,0)	43 (100,0)	

p*: Chi-cuadrado. RNVS: recién nacido vivo sano.

Tabla 16. *Tasas Embarazo/ciclo según Tipo de Antioxidante en ICSI.*

4. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS GESTACIONALES

TASA DE ABORTO

En la **Tabla 17** se describe la tasa de aborto encontrada en **259 ciclos de tratamientos de reproducción asistida**, considerando tanto los ciclos realizados de IAC como los de ICSI, sumando tanto los controles como los antioxidantes.

Se consiguieron **76 embarazos bioquímicos** en total, y de ellos hubo **23 abortos**, lo que supone una **tasa de aborto por ciclo del 30.2%**.

Si diferenciamos la tasa de aborto según grupos de estudio, observamos que el control y el único tienen una tasa similar (**22,2% vs 21,1%**), pero sube considerablemente en el grupo de antioxidantes combinados (**43,3%**), aunque estas importantes diferencias no han sido significativas ($p=0,134$).

Nº Ciclos	Embarazo (n)	Aborto (n)	%	p*
Control (129)	27	6	22,2	0,134
Antioxidantes (130)	49	17	34,7	
Antiox. Único (59)	19	4	21,1	
Antiox. Combinados (71)	30	13	43,3	
Total (259)	76	23	30,2	

p*: t-Student

Tabla 17. Tasa de aborto en TRA (IAC+ICSI) según antioxidantes vs control.

En la **Tabla 18** se describe la tasa de aborto encontrada en **162 ciclos de ICSI**, sumando tanto los controles como los antioxidantes.

Se consiguieron **51 embarazos bioquímicos** en total, y de ellos hubo **15 abortos**, lo que supone una **tasa de aborto por ciclo del 29,4%**.

La tasa en controles y únicos fue similar (**22,2% vs 20,0%**) aumentando considerablemente en combinados (**44,4%**) pero sin significación estadística.

Resultados

Nº Ciclos	Embarazo (n)	Aborto (n)	%	p*
Control (78)	18	4	22,2	0,61
Antioxidantes (84)	33	11	33,3	0,26
Antiox. Único (41)	15	3	20,0	
Antiox. Combinados (43)	18	8	44,4	
Total (162)	51	15	29,4	

p*: t-Student

Tabla 18. Tasa de aborto en ICSI según antioxidantes vs control.

En la **Tabla 19** se describe la tasa de aborto encontrada en **97 ciclos de IAC**, sumando tanto los controles como los antioxidantes. Se consiguieron **25 embarazos bioquímicos** en total, y de ellos hubo **8 abortos**, lo que supone una **tasa de aborto por ciclo del 32,0%**. La tasa en controles y únicos fue similar (**22,2% vs 25,0%**) aumentando considerablemente en combinados (**41,6%**) pero sin significación estadística.

Nº Ciclos	Embarazos (n)	Aborto (n)	%	p*
Control (51)	9	2	22,2	0,73
Antioxidantes (46)	16	6	37,5	0,61
Antiox. Único (18)	4	1	25,0	
Antiox. Combinados (28)	12	5	41,6	
Total (97)	25	8	32,0	

p*: t-Student

Tabla 19. Tasa de aborto en IAC según antioxidantes vs control.

5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NACIMIENTOS DE LOS NIÑOS NACIDOS VIVOS SANOS TRAS IAC E ICSI EN TODOS LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En la **Tabla 20** se describen como finalizaron los embarazos que dieron lugar a recién nacidos vivos y sanos.

Todos los niños nacieron en torno a la semana 38, los pesos alrededor de 3000 gramos, el tipo de parto (eutócico o cesárea) fue similar.

No hubo diferencias significativas en ningún parámetro analizado comparando controles con antioxidantes.

Hubo en los nacidos tras ICSI más niños que niñas en todos los grupos (75 vs 25%), pero sin significación estadística.

Resultados

IAC	CONTROL	ANTIOX. ÚNICO	ANTIOX. COMBINADO	p*
SEMANA	38,71 (1,4)	38,00 (1,4)	38,57 (1,4)	0,817
PESO	3.385,7 (308,5)	2.950,0 (353,6)	3.132,8 (417,2)	0,268
SEXO				0,550
NIÑO	4 (51,1%)	1 (50%)	2 (28,6%)	
NIÑA	3 (42,9%)	1 (50%)	5 (71,4%)	
TIPO PARTO				0,274
CESÁREA	2 (28,6%)	0	4 (57,1%)	
EUTÓCICO	5 (71,4%)	2 (100%)	3 (42,9%)	
ICSI				
SEMANA	38,44 (1,7)	37,67 (2,8)	38,00 (1,7)	0,628
PESO	2.988,7 (415,4)	2.881,2 (640,4)	2.959,0 (429,5)	0,851
SEXO				0,950
NIÑO	12 (75%)	9 (75%)	8 (80%)	
NIÑA	4 (25%)	3 (25%)	2 (20%)	
TIPO PARTO				0,198
CESÁREA	10 (62,5%)	6 (50,0%)	4 (40%)	
DISTÓCICO	0	2 (16,7%)	0	
EUTÓCICO	6 (37,5%)	4 (33,3%)	6 (60%)	

p*: Chi-cuadrado

Tabla 20. Resultados de la gestación, tipo de parto, peso y sexo de los recién nacidos según IAC vs ICSI y según control vs antioxidantes único o combinados (X y

DISCUSSION

Son múltiples las evidencias indicativas de que la calidad seminal está disminuyendo de forma notable en los últimos años, sobre todo en países industrializados y desarrollados.

Se estima que *la calidad seminal está descendiendo a un ritmo de un 1.5% cada año en EEUU, y en Europa aún es más acusado, un 3.1% anual.*

Hay una realidad incuestionable: *estamos inmersos en un descenso global de la fertilidad.*

Las razones probablemente son múltiples, como se ha descrito en la introducción, pero *los cambios medio-ambientales junto a la acción de los disruptores endocrinos y el estrés oxidativo, están incidiendo en el ser humano, sobre todo en el varón, aumentando notablemente la llamada “astenospermia idiopática”, objeto principal de esta tesis doctoral.*

Hace 60 años el Profesor Botella Llusía (90) ya publicó que, la medición de la movilidad progresiva lineal del espermatozoide humano, era un indicador in vitro de la calidad y función espermática.

Zini y Al-Hathal (52), urólogos en Montreal, proponen como objetivo de su artículo, discutir la *“racionalidad” de la terapia antioxidante en el varón estéril.* De hecho, titulan su artículo preguntándose si, *¿la terapia antioxidante es una realidad o una ficción?*

Hasta la fecha actual, muchos estudios clínicos sugieren que los suplementos nutracéuticos antioxidantes, son beneficiosos a la hora de mejorar la función espermática y la integridad del DNA.

Sin embargo, el mecanismo de acción exacto de los antioxidantes orales y sobre todo, su dosis adecuada, no ha sido establecido, incluso se han postulado efectos negativos de una sobredosificación de antioxidantes que ocasionaría una acción pro-oxidativa que tendría un efecto contrario, deletéreo para el espermatozoide y hasta el momento muy difícil de cuantificar.

La racionalidad de tratar al varón estéril con antioxidantes, se basa en la premisa de que, el estrés oxidativo seminal (muy frecuente en el varón estéril), se debe, en parte, a una deficiencia en antioxidantes seminales.

La facilidad para prescribir antioxidantes orales también se fundamentaría en los pocos efectos adversos descritos, aunque escasos estudios han evaluado cuidadosamente el riesgo del sobretratamiento con antioxidantes (53).

De modo ideal, un antioxidante oral debe alcanzar altas concentraciones en el sistema reproductor y completar la deficiencia en elementos vitales que son necesarios para la espermatogénesis. Por otra parte, el suplemento antioxidante debe aumentar su capacidad de acción en el plasma seminal y reducir los niveles de ROS en semen (52).

Sin embargo, las concentraciones de ROS en semen, no deben ser suprimidas completamente por los antioxidantes orales, ya que esto condicionaría una alteración en las funciones espermáticas normales, como la capacitación espermática y su hiperactivación, que precisan de unas cantidades mínimas pero necesarias de ROS (54, 52).

Dattilo y cols publican recientemente, en 2014 (91), un estudio que es el primero en insistir en utilizar los llamados, *antioxidantes “suaves”* como suplementos nutricionales, basado en el llamado “ciclo de un carbono”.

Nos están informando que no todos los antioxidantes se pueden combinar sin más, sino que unos son más suaves que otros.

Es un método alternativo terapéutico, basado en no dañar el sistema homeostático del cuerpo humano.

Un ataque oxidativo, puede ser neutralizado por el metabolismo endógeno, por medio del agente reductor universal, la glutatión reductasa (GHS). Su síntesis se produce a través de la trans-sulfuración de la homocisteína, la cual se origina a través del llamado “ciclo de un carbono”.

Un soporte nutricional oral que active el “ciclo de un carbono” debe contener: todas las vitaminas B (B2, B3, B6, B12 y B9) fundamentales para sintetizar homocisteína, N-acetilcisteína y/o cistina, que es el único precursor oral biodisponible para la síntesis de GHS, y zinc, cofactor esencial para activar las dos llaves enzimáticas.

El zinc y la vitamina B9, administrados oralmente, aumentan el contenido de protamina espermática y potencian la integridad del acrosoma. La N-acetilcisteína es soluble, fácilmente absorbida y transformada intracelularmente en cisteína. Esta sustancia mejora los parámetros seminales y el estado oxidativo en varones con infertilidad masculina (88). La vitamina B coadministrada junto al zinc a dosis de 20mg/día, es absorbida intracelularmente y mejora la motilidad espermática y su capacidad fertilizante. Para ellos, suficiente con: vitaminas B, N-acetilcisteína y zinc.

Mortimer y cols (92) han publicado también recientemente, un estudio importante realizado por investigadores expertos en fisiología y andrología de varios continentes, analizando multitud de sustancias que el hombre ingiere, inhala o contacta, incluyendo en sus consideraciones a los suplementos orales nutracéuticos, y su implicación con la fertilidad humana y animal

Insisten estos investigadores en que hay numerosas sustancias que pueden alcanzar al espermatozoide en la vida diaria, y que no se sabe nada de ellas con carácter científico, solo que se ha asumido de modo general y desde siempre, que son “sanas” para el espermatozoide, pero basada esta creencia en la ausencia de cualquier evidencia de daño celular.

En sus objetivos, incluyeron en su listado: productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimentos procesados, alimentos empaquetados, cosméticos y productos de uso diario y general, así como, sustancias utilizadas en tratamientos de reproducción asistida.

Respecto a los suplementos nutracéuticos, hacen referencia a la revisión antigua de Cochrane de 2011 (93), donde casi todo quedaba por demostrar, e insisten en que su mecanismo de acción no está suficientemente aclarado.

Ellos resumen que, para definir que *una sustancia (en este caso, los nutracéuticos), es “sana para el espermatozoide”, tiene que cumplir el criterio de que la función espermática NO esté afectada negativamente por esa sustancia, concretamente: la función endocrina del varón, la producción espermática (número y morfología), la motilidad espermática, el DNA*

espermático, la fertilización, la división y calidad embrionaria, la tasa de embarazo, el grado de aborto, y el nacimiento de un niño vivo y sano.

Hasta que todos estos objetivos no se cumplan, con los estudios apropiados, no se puede decir que una sustancia es sana para el espermatozoide.

Sorprende la minuciosidad descriptiva e investigadora coordinada en este estudio publicado en 2013, al descubrir y citar en su bibliografía, un trabajo publicado en 1956, hace casi 60 años, por un eminente maestro de obstetras y ginecólogos españoles, el Profesor Botella-Llusiá.

Hasta el día de hoy, más de 150 trabajos clínicos y experimentales han evaluado el efecto de los antioxidantes sobre los parámetros seminales, pero a pesar de esta enorme producción científica, no nos resulta posible establecer firmes conclusiones respecto a que los antioxidantes son beneficiosos para tratar al varón estéril, debido a que los estudios son: muy heterogéneos, no controlados, muestras pequeñas, no comparativos, y apenas se ha valorado como éxito primario de esta terapia, la tasa de embarazo, y que decir, de la tasa de embarazo clínico o de nacido vivo (8).

Además, el posible mecanismo de acción de los antioxidantes orales en el tratamiento de la esterilidad del varón (supresión del estrés oxidativo seminal), no ha sido totalmente confirmado en los escasos estudios realizados en este sentido.

Tampoco existen estudios que confirmen las dosis óptimas, la duración del tratamiento, que antioxidante es el más adecuado, o la población de varones que pueden beneficiarse más de esta terapia (astenospermia aislada, oligoastenospermia, teratospermia, o fragmentación del DNA).

Los antioxidantes comercializados por la industria farmacéutica como suplementos nutracéuticos de toma oral, constituyen una forma cómoda y sencilla de intentar mejorar el estrés oxidativo en exceso al que pueden estar sometidos los espermatozoides de varones afectados de astenospermia idiopática.

Discusión

Existen diversas sustancias con actividad antioxidante, descritas con detalle en la introducción.

De todas ellas, los ácidos grasos omega 3 y omega 6, son los más novedosos, existiendo muy escasa información sobre sus resultados en el tratamiento del varón subfértil, y mínima, en ciclos de reproducción asistida.

CAPÍTULO 1. REVISIONES SISTEMÁTICAS Y META-ANÁLISIS

La idea de diseñar este estudio, surgió en el año 2011, ante la comercialización de este tipo de antioxidantes ácidos grasos, coincidente en el tiempo con la primera gran revisión actualizada, planteada por la librería *Cochrane* sobre este tema: “*Antioxidants for male subfertility*” (93).

Esta revisión planteó como objetivo evaluar el efecto de la administración oral de suplementos con antioxidantes a los varones subfértiles en parejas estériles, ya que los aislados resultados bibliográficos, eran discordantes en cuanto a si mejoraba la tasa de embarazo y los parámetros seminales.

Por otra parte, muy pocos estudios valoraban la tasa de nacido vivo y sano tras realizar Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). La estrategia de la búsqueda bibliográfica se basó, en el Registro del *Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility*, *Cochrane Library*, *MEDLINE*, *EMBASE*, *CINAHL*, *PsycINFO* y *AMED databases*, desde su inicio hasta el mes de febrero del 2010. Los criterios de selección fueron, estudios controlados, aleatorizados, que utilizaran cualquier antioxidante en varones estériles.

Seleccionaron 34 estudios con 2876 varones evaluados en total. Las medidas para la valoración del éxito fueron: tasa de nacido vivo, tasa de embarazo, tasa de aborto, fragmentación del DNA, motilidad y concentración espermática, y efectos adversos de los suplementos en el varón.

Los autores concluyeron en el 2011 que, la toma oral de suplementos con antioxidantes por el varón, puede ayudar a aumentar la tasa de embarazo, pero se precisan mas estudios controlados y bien diseñados, que informen de niños nacidos vivos y sanos (sólo encontraron 3 trabajos que informaban de nacidos vivos: concretamente 20 nacidos vivos en un total de 214 parejas).

Tampoco había estudios suficientes con antioxidantes combinados, y nada comparativo entre antioxidantes únicos y combinados (head to head).

Tampoco existían datos suficientes para evaluar los efectos de diferentes dosis de antioxidantes, ni el tiempo adecuado de uso, para conseguir los mejores resultados.

Dejaron el tema totalmente abierto, para que posteriormente, los investigadores evaluáramos sus recomendaciones, diseñáramos nuevos trabajos metodológicamente bien estructurados y con mayor número de casos, con la finalidad de intentar aclarar si estos suplementos nutricionales administrados al varón subfétil, mejoran la tasa de embarazo y sobre todo de nacido vivo y sano, siendo una recomendación a seguir mayoritariamente en los centros dedicados a la reproducción asistida.

Esta prestigiosa librería *Cochrane*, dejó pasar un tiempo, esperando la aparición de nuevas publicaciones que aclarasen muchas de las incógnitas planteadas, y casi cuatro años después, en Diciembre del 2014, los mismos revisores encabezados de nuevo por la australiana Marian Showell, vuelven a retomar la revisión del tema y realizan su reciente y último meta-análisis, ampliando la revisión anterior, incorporando los trabajos publicados desde Febrero del 2010 hasta 31 de Enero del 2014 (agregaron a la anterior revisión lo publicado en los últimos 4 años) (94).

Estos revisores se plantearon de nuevo como objetivo, valorar la efectividad de la suplementación oral con antioxidantes en el varón subfétil, en parejas con deseo reproductivo, independientemente de si precisaban TRA o no. Investigaron en los mismos registros que en el 2011, dando por concluida su búsqueda el 31 de Enero del 2014.

Incluyeron estudios controlados y randomizados, que comparen cualquier tipo o dosis de antioxidante (único o combinado), tomado por el varón de una pareja con esterilidad, randomizado con placebo, no tratamiento u otro antioxidante.

En esta ocasión, toman como objetivo primario de éxito, la tasa de niño nacido vivo por pareja randomizada (definición preferida: nacimiento de un feto vivo de más de 20 semanas), y como éxitos secundarios: tasa de embarazo clínico por pareja (definida por la presencia de un saco gestacional confirmado por

ecografía a partir de la semana 7), acontecimientos adversos, fragmentación de DNA, motilidad y concentración espermática.

Seleccionaron *48 estudios* (estos 4 años de espera aportaron 14 trabajos más que en el 2011), que incluían *4179 hombres subfértiles*, de los cuales *2466 fueron tratados con antioxidantes y 1713 pertenecían a los grupos control o no tratamiento*.

Una parte de las parejas, habían consultado en clínicas de fertilidad y buscaban embarazo como mínimo durante 1 año. La edad del varón osciló entre 20 y 52 años y la mayoría se diagnosticaron de oligospermia y/o astenospermia, pero no todos fueron de causa idiopática. El estudio de fertilidad de la mujer era normal.

Pero lamentablemente, de los *48 trabajos seleccionados, solo habían seleccionado 4 dedicados a TRA, 3 con FIV-ICSI (63,66,62) y 1 con IAC (95)*.

Muy poca información metodológicamente bien diseñada sobre antioxidantes en reproducción asistida, existía en la literatura. Esto fue determinante para diseñar y realizar este proyecto investigador.

Respecto a la *forma de expresión de resultados*, de los 48 estudios:

- 25 estudios informaban de parámetros seminales básicos.
- 2 estudiaron la fragmentación de DNA: (66,96).
- 20 informaban de embarazo bioquímico valorado por B-hCG+.
- 7 expresaban en sus resultados la tasa de embarazo clínico por pareja (Attallah tras IAC (95), Azizollahi (97), Kessoupolou (63), Omu (59), Suleiman (64), Tremellen (62) y Zavaczki (98) .

De estos 7 estudios, en sólo 2 *realizaron FIV-ICSI* y fueron tratados 90 varones, observando los revisores que la toma de antioxidantes de modo significativo no se asociaba con un aumento de la tasa de embarazo clínico comparado con placebo (OR 2.64, 95% CI 0.94 a 7.41, $p=0.07$).

Discusión

- Sólo 4 informaban de nacido vivo por pareja: Kessopoulou tras FIV (63), comparando vitamina E vs placebo; Omu (59) concepción natural, comparando zinc vs no tratamiento; Suleiman (64) concepción natural, comparando vitamina E vs placebo y Tremellen (62) tras FIV, comparando antioxidantes combinados vs placebo.

Respecto a los *grupos de estudios randomizados*:

- 24 estudios compararon antioxidante con placebo. De ellos, hubo 2 estudios, de Kessopoulou (63) y Suleiman (64), que comparando vitamina E con placebo en 117 varones, observaron un aumento de la tasa de embarazo clínico de modo significativo, (OR 6.71, 95% CI 1.98 a 22.69, $p=0.002$).
- 7 estudios compararon antioxidante con placebo o no tratamiento. De ellos, hubo 2 estudios, de Azizollahi (97) y Omu (59), que comparando zinc con placebo o no tratamiento en 153 varones, también observaron un incremento significativo de la tasa de embarazo clínico, (OR 4.43, 95% CI 1.39 a 14.4 $p=0.01$).
- 7 estudios compararon antioxidantes con antioxidantes (head to head), y ninguno informó de tasa de embarazo clínico y menos, de nacido vivo.

Respecto al *tipo de antioxidante* utilizado:

Una gran variedad de antioxidantes fueron utilizados en estos estudios: magnesio, zinc, ácido fólico, N-acetilcisteína, coenzima Q10, vitaminas E, B y C, selenio, DHA y carnitinas.

Respecto a *efectos adversos gestacionales (aborto)* :

- sólo 3 estudios los mencionan : Omu (59) , Suleiman (64) y Tremellen (62).
El número de abortos fue muy bajo: 8 abortos en 247 parejas.

Concluyeron los revisores que no existía ninguna asociación significativa entre utilizar antioxidantes y aborto cuando se compara con placebo o no tratamiento (OR 1.74, 95% CI 0.40 a 7.60, $p=0.46$).

Respecto a *efectos adversos derivados de la toma* de antioxidantes:

- solo se describieron de tipo gastrointestinal en 6 estudios, sin mostrar ninguna asociación significativa con los suplementos antioxidantes.

Respecto a *los parámetros seminales* se basaron en analizar la *fragmentación de DNA* y en cuantificar la *concentración y motilidad* espermática a los 3, 6 y 9 meses de toma de antioxidantes.

- Respecto a la *fragmentación del DNA*, sólo fue valorada en 2 estudios con 100 varones, Greco (66) y Martínez-Soto 2010 (96), utilizando Greco, vitamina C mas vitamina E en 64 varones, y en el otro, DHA en 36 varones.

Si que se observó una disminución significativa en la fragmentación del DNA cuando se utilizan los anteriores antioxidantes comparado con placebo (MD-13.85, 95% CI -17.28 a -10.42, $p < 0.00001$).

- Respecto a los *parámetros básicos seminales*, los hallazgos referentes a *concentración y motilidad* valoradas a los 3, 6 y 9 meses de tratamiento, *fueron inconsistentes y no concluyentes, debido a la gran heterogeneidad existente en cada estudio.*

De los 25 estudios que informaban de parámetros seminales, sólo 6 se pudieron valorar por su baja heterogeneidad. En estos seis trabajos los resultados fueron:

- vitamina C + vitamina E vs placebo : 2 trabajos, Greco (66) y Rolff (68) con 95 varones, ninguna asociación positiva respecto a aumentar la motilidad a los 3 meses.
- Carnitinas vs placebo : 2 trabajos, Balercia (73) y Lenzi (89) con 116 varones. No asociación respecto a incrementar la concentración a los 6 meses.
- Antioxidantes combinados vs placebo o no tratamiento : 2 estudios en 228 varones, Scott (69) y Morgante (99). Sí asociación con un incremento en la motilidad espermática a los 3 meses de tratamiento.

Cuando los revisores quisieron analizar los escasos nuevos estudios existentes comparando antioxidante vs antioxidante (head to head), no pudieron sacar conclusiones, pues no aportaban datos de nacido vivo, embarazo clínico o efectos adversos, y desistieron de analizar en ellos los parámetros seminales, al considerar a estos trabajos, inconsistentes.

Respecto a *resultados gestacionales*:

- *Tasa de Nacido Vivo*: los antioxidantes *pueden* aumentar la tasa de nacido vivo (OR 4.21, 95% CI 2.08 a 8.51, $p < 0.0001$), pero este resultado se basó sólo en 4 pequeños trabajos, con 277 parejas analizadas, y sólo con 44 niños nacidos en total. Calidad de esta evidencia, “*baja*”.
- *Tasa de Embarazo Clínico*: los antioxidantes *pueden* incrementar la tasa de embarazo clínico (OR 3.43, 95% CI 1.92 a 6.11, $p < 0.0001$). Sólo pudieron evaluar a 7 pequeños trabajos con 522 varones. Calidad de la evidencia: “*baja*”.

Respecto a *efectos adversos*:

- *Tasa de aborto*: *no se pronuncian* los revisores porque sólo 3 trabajos informan de abortos (OR 1.74, 95% CI 0.40 a 7.60, $p = 0.46$). Calidad de la evidencia: “*muy baja*”.
- *Efectos Adversos* del antioxidante: los únicos descritos fueron gastrointestinales (vómitos, dispepsia, diarrea) y tampoco extraen conclusiones (OR 1.6. 95% CI 0.47 a 5.50, $p = 0.46$). Calidad de la evidencia: “*muy baja*”.

Los revisores siguieron observando las mismas limitaciones que en la revisión previa del 2011: defectos en la metodología, imprecisiones, gran heterogeneidad, muestras pequeñas.

Por todo ello, los revisores valoraron las evidencias obtenidas en general, con un grado de rigor, “bajo” o “muy bajo”.

Los revisores en Enero de 2015 *concluyeron*:

- Imposible extraer conclusiones de los nuevos estudios comparativos de antioxidantes vs antioxidantes (head to head), por ser muy insuficientes para el análisis.
- No se puede hacer ninguna referencia al análisis de las variables, tiempo de suplementación y dosis de antioxidantes, por no ser analizados en ningún estudio.
- Ningún estudio definió la tasa de nacido vivo como el éxito primario y muy pocos incluyeron a la tasa de embarazo clínico como éxito primario.
- Desde un punto de vista *práctico*, los clínicos pueden recomendar la toma de antioxidantes por los varones subfértiles, en parejas que desean concebir, como parte de un programa de Reproducción Asistida. Sin embargo, a estas parejas hay que advertirlas de que:
- “las evidencias actuales no son concluyentes y que se siguen necesitando estudios bien diseñados, controlados, con un número amplio de parejas, randomizados, y que expresen sus resultados con tasas de embarazo clínico y de nacido vivo, para poder clarificar el papel de los antioxidantes sobre todo en programas de Reproducción Asistida”.

Desde un punto de vista de *investigación* futura a desarrollar que:

- la tasa de nacido vivo es la forma estadística más adecuada de expresar los resultados de un tratamiento de Reproducción Asistida. La gran mayoría de estudios revisados no lo expresaron así.
- Invitan a realizar estudios clínicos cuyos resultados se expresen como tasa de embarazo clínico y de nacido vivo, como éxitos primarios.
- realizar estudios que analicen la tasa de aborto tras tomar antioxidantes comparando con controles, en ciclos de TRA.
- son insuficientes los estudios sobre antioxidantes combinados vs control
- hay que realizar estudios comparativos antioxidante vs antioxidante, para valorar si uno es más efectivo que otro. No hay prácticamente ningún estudio útil comparativo, entre antioxidante único vs combinados.

Discusión

- no hay estudios diseñados para valorar el efecto de diferentes dosis de antioxidantes.
- también sería ideal precisar con más exactitud, el perfil de efectos adversos posibles, secundarios a estos antioxidantes.

Están publicadas *otras revisiones* que es conveniente conocer, sobre las conclusiones emitidas por *otros expertos revisores en meta-análisis*, realizadas con anterioridad a las publicadas por *Cochrane* (1,2) y compararlas entre ellas.

Son las siguientes:

- Agarwal (100) revisó la literatura hasta 2004, sobre antioxidantes y subfertilidad masculina. Concluyó que tanto la carnitina sólo como otros antioxidantes combinados (vitamina E, N-acetilcisteína, vitamina A y ácidos grasos), mejoran la motilidad y la tasa de embarazo en varones astenozoospermicos. También que la vitamina E mejora la tasa de embarazo clínico.

La revisora *Cochrane* es discrepante con este autor, pues refieren que los antioxidantes, pueden aumentar la tasa de embarazo y sólo observaron asociación positiva respecto a la motilidad espermática valorada a los 3 meses de utilizar antioxidantes combinados, comparando con placebo, en pocos estudios bien diseñados.

Como se aprecia, los propios revisores de meta-análisis, que analizan los mismos trabajos existentes en la literatura, discrepan entre ellos con opiniones diferentes.

- Zhou en 2007 (101), realizó una revisión sistemática de 9 trabajos relevantes publicados entre 2002 y 2006, comparando L-carnitina y L-acetilcarnitina con placebo. Todos menos uno consideraron la tasa de embarazo (B-hCG +), como éxito primario del tratamiento. Encuentran mejoría significativa en la tasa de embarazo (OR= 4,10, 95% CI (2,08, 8,08, p <0,0001), y en la motilidad espermática total (WMD = 7,43, 95% CI , (1,72, 13,14), p=0,04. Por el contrario, ninguna diferencia significativa fue encontrada en la concentración espermática ni en el volumen seminal.

Concluyeron que la eficacia de las carnitinas sobre la infertilidad masculina necesita más investigación, incluyendo estudios biológicos del metabolismo del espermatozoide, utilizando estudios moleculares y celulares a nivel de las funciones intracelulares de las organelas. *Cochrane* también difiere de esta revisión, ya que no extrajo ninguna conclusión de las carnitinas, pues para ellos, los trabajos eran muy inconsistentes.

- Patel (102) discute la mejoría observada en la tasa de embarazo cuando se toman antioxidantes y no observa mejoría en la motilidad espermática, recomendando que son necesarios más trabajos bien diseñados en varones con estrés oxidativo.

Cochrane si coincide con este autor y está en su línea, tanto en resultados seminales como gestacionales.

- Ross (57) observó en su revisión que la terapia antioxidante mejora la calidad espermática y la tasa de embarazo.

Cochrane discrepa y no concluye igual, en cuanto a los parámetros seminales, porque dice que son estudios de extrema heterogeneidad.

- Lafuente (103), realizó en 2013 una revisión sistemática, sobre el efecto del Coenzima Q10 en el varón subfétil. Su meta-análisis lo realizó solo con 3 estudios: Balercia 2009 (73), Safarinejad 2009 (77) y Nadjarzadeh 2011 (79). El análisis lo efectuó en 149 varones que tomaron Q10 y en 147 placebos.

Los resultados indican que los varones que tomaron Q10 tienen un incremento significativo en: la concentración de Q10 seminal (RR 49.55, 95% CI, 46.44 a 52.66, I²=17%), en la concentración espermática (RR 5.3, 95% CI 4.18 a 6.47, I²=58%), y en la motilidad espermática (RR 4.50, 95% CI 3.92 a 5.08, I²=0%).

A pesar de que el objetivo primario de la revisión fue analizar la tasa de nacido vivo, ningún estudio proporcionó datos de ellos. Los resultados del

meta-análisis muestran que la suplementación al varón infértil con Q10, no incrementa la tasa de embarazo.

- Balercia (73) informó de 9 embarazos, 6 en el grupo Q10 (6 de 28) y 3 en el grupo placebo (3 de 27). Los otros dos estudios no informan de ningún embarazo espontáneo en ningún grupo de estudio.

Cochrane, analizando los mismos estudios matizó que, se observa una mejoría en la calidad seminal a los 6 meses con Q10, pero no se pueden sacar conclusiones pues estos tres trabajos son muy heterogéneos.

- Kumalic 2014 (104), revisa lo publicado en el periodo 2000-2013. La mayoría de sus estudios revisados fueron randomizados y con placebo, pero no todos, y sus resultados confirman el efecto beneficioso de los antioxidantes en la infertilidad OAT idiopática, sobre al menos uno de los parámetros seminales, siendo el efecto mayor, la mejora de la motilidad espermática.

Muchos de estos estudios ya se realizaron con antioxidantes combinados. No llegan a poder definir la dosis óptima de los diferentes antioxidantes. Los antioxidantes más frecuentemente empleados en los estudios fueron: vitamina E y C, selenio, coenzima Q10, N-acetil-cisteína, carnitina y zinc.

Los efectos más favorables en astenospermia idiopática se observaron con vitamina E, coenzima Q10, y selenio.

Concluyen que los antioxidantes son importantes para proteger al semen de las ROS y pueden mejorar los parámetros básicos seminales en casos de OAT idiopática. Estos revisores eslovacos, en sus conclusiones, no hacen ninguna mención a resultados gestacionales.

Hay que insistir en que, en todas estas revisiones, cuando describen los autores la tasa de embarazo, se basan únicamente en tasa de embarazo bioquímico (B-hCG)+, mientras que *Cochrane* valora de manera mucho mas real y exacto el embarazo, al considerar los trabajos que informan de, tasa de embarazo clínico (ecografía en semana 7 con latido positivo) y de nacido vivo sano.

Por otra parte, hay investigadores que informan de que los antioxidantes administrados a dosis altas (que no concretan), pueden tener efectos nocivos sobre el espermatozoide, por un efecto llamado prooxidativo.

Así, Dattilo y cols (91) recientemente en 2014 refieren que, la estructura de la cromatina espermática puede ser alterada principalmente por estrés oxidativo.

Los tratamientos con antioxidantes no siempre mejoran la fertilidad y cuando son administrados a altas dosis pueden bloquear el proceso esencial oxidativo que afecta a la compactación de la cromatina

Dos recientes revisiones clínicas sobre tratamientos con antioxidantes en la infertilidad masculina, Gharagozloo 2011 (83), y Lombardo2011 (105), advierten de que cuando se utilizan antioxidantes combinados a altas dosis, se pueden aumentar los riesgos derivados de una pérdida de las fisiológicas y esenciales especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual afectaría al proceso fisiológico de la capacitación espermática interfiriendo en la reacción acrosómica, dificultando la fecundación.

Estos antioxidantes a altas dosis, tienen la capacidad de alterar el proceso esencial de la compactación de la cromatina espermática formando puentes disulfuro entre los grupos -SH de las protaminas enriquecidas con cisteína.

Estos antioxidantes, aunque pueden mejorar algunas fracciones del daño oxidativo (como la fragmentación del DNA), pueden también, combinados y a altas dosis, alterar la descondensación nuclear de la cromatina, situación que ya ha sido observada en otros ensayos clínicos, Menezo 2007 (106).

Nuestro estudio prospectivo, tras considerar las grandes controversias aún existentes en las revisiones de la literatura, respecto a la utilidad de los antioxidantes en el varón subfertil, estableció unos objetivos muy claros y definidos, siguiendo las recomendaciones que la prestigiosa librería *Cochrane* dirigía a los investigadores en el 2011 y después ratificó en 2015:

“las evidencias actuales no son concluyentes y se siguen necesitando estudios bien diseñados, controlados, con un número amplio de parejas, randomizados, y que expresen sus resultados con tasas de embarazo clínico y

Discusión

de nacido vivo”, para poder clarificar el papel de los antioxidantes, sobre todo en programas de Reproducción Asistida.

CAPÍTULO 2. RESULTADOS A DEBATIR CON OTROS INVESTIGADORES

Todo el estudio objeto de esta Tesis, se ha realizado en parejas que precisaban de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), bien IAC o ICSI, debido a una astenospermia idiopática leve o severa, y muy pocos trabajos hay descritos en la literatura en este sentido.

Hemos descartado estudiar varones que buscaban un embarazo espontáneo sin TRA.

Los *resultados observados* los vamos a debatir en este orden:

1. Resultados referentes a posibles cambios tras tomar antioxidantes en los “parámetros seminales, concentración y motilidad progresiva”.

Este capítulo es donde más información existe, pero todo muy confuso y heterogéneo. Discutimos nuestros resultados.

2. Resultados referentes a diferentes “tasas de embarazo”.

La calidad de la evidencia de lo existente es, “baja o muy baja”.

Aportamos como gran novedad, la expresión de resultados con diferentes tasas de embarazo: tasa de embarazo bioquímico (B-hCH+), (lo que hacen la mayoría de investigadores), tasa de embarazo clínico (muy pocos trabajos lo mencionan), tasa de embarazo viable (no mencionado en la literatura) y tasa de nacido vivo y sano, el gran objetivo de nuestro estudio, no referido apenas en la literatura.

Para ello, tuvimos que esperar, tras cerrar el último ciclo de tratamiento, 9 meses más, para poder tener todos los datos recogidos del nacimiento del último niño.

3. Resultados referentes a “estudiar comparativamente antioxidantes entre sí”: “head to head”.

No existen estudios que comparen un antioxidante único a base de ácido graso omega 3 con antioxidantes combinados, y que informen de tasa de nacido vivo sano. En nuestro estudio lo aportamos.

4. Resultados referentes a “acontecimientos adversos gestacionales”: tasa de aborto.

Es otra aportación novedosa y quizás la más sorprendente e inesperada por el investigador al analizar los resultados.

No existe casi nada en la literatura, sólo tres publicaciones con muy pocos casos lo mencionan, sin poder hacer ningún estudio estadístico, siendo la calidad de la evidencia existente muy baja.

5. Resultados referentes a “efectos adversos generales del antioxidante” tras su toma oral.

Lo contrastamos con la literatura. Calidad de evidencia existente muy baja.

La discusión con la bibliografía existente, se ha realizado separando dos grandes capítulos:

A) antioxidantes en varones que no precisan de TRA

B) antioxidantes en varones que si precisan de TRA (IAC y FIV-ICSI)

2.1. DISCUSION en la valoración de PARAMETROS SEMINALES y RESULTADOS GESTACIONALES en varones subfértiles, tratados con diversos antioxidantes, en parejas que NO REALIZAN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÖN ASISTIDA

En realidad, este subcapítulo de la Tesis no ha constituido uno de los objetivos principales de ella, ya que todos los varones subfértiles tratados con antioxidantes en nuestro estudio, sí realizaron TRA, pero merece la pena

completar nuestros análisis con la importante bibliografía existente en este sentido.

2.1.1. DISCUSIÓN CON AUTORES QUE SOLO ANALIZAN CAMBIOS SEMINALES.

1. Safarinejad en 2009 (77) publicó un estudio controlado con placebo, randomizado por bloques permutados y doble ciego de alta calidad, comparando el antioxidante CoQ10 con placebo.

Analizó a 212 varones diagnosticados de infertilidad por OAT idiopática. Edad media de 28 años (21-42). La dosis de Q10 fue 300 mg/día en 106 varones y placebo en otros 106 varones, durante 26 semanas. La medición de éxito primario fueron los parámetros seminales y el volumen testicular, y el secundario los efectos adversos y los niveles hormonales. La tasa de embarazo no se consideró como éxito.

Sus resultados indican una mejoría significativa en la calidad seminal, tanto en la concentración como en la motilidad, de los varones tratados con Q10: concentración espermática (M/ml)): (Q10 26.4 ± 4.4 vs placebo 20.8 ± 4.3), motilidad espermática (%) (Q10 27.6 ± 2.2 vs placebo 23.1 ± 2.1).

2. Nadjarzadeh y cols en 2011 (107) publicaron un estudio muy similar al anterior, comparando también Q10 con placebo, pero con menos casos, dosis ligeramente inferiores de Q10 y menor tiempo de tratamiento, y los resultados fueron totalmente discordantes.

Realizaron un estudio controlado y randomizado, doble ciego en 60 varones diagnosticados de infertilidad por OAT idiopática. Edad media 34 años (25-46). La dosis de Q10 fue 200 mg/día en 30 varones y otros 30 con placebo. Duración 12 semanas. Valoraron como éxito primario los parámetros seminales y la peroxidación lipídica, y como secundarios la capacidad antioxidante del plasma seminal y los efectos adversos.

Sus resultados respecto a la concentración espermática (M/ml), fueron similares en ambos grupos (Q10 16.09 ± 2.9 vs placebo 16.21 ± 12.7). Respecto

a la motilidad (%), fue ligeramente superior con Q10 pero no significativo (Q10 41.91 ± 15.6 vs placebo 38.33 ± 18.4).

3. Este mismo equipo de investigadores dos años después, en 2013 (108), publican un nuevo estudio con Q10, incorporando el análisis de la actividad de los enzimas antioxidantes.

Ellos comentan que la coenzima Q10, se ha utilizado como antioxidante para multitud de condiciones que causan estrés oxidativo: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, neuromusculares y enfermedades infecciosas, y que numerosos estudios indican que el Q10 también juega un importante papel en el mantenimiento de las normales funciones celulares y orgánicas y en la mejora de la salud.

Es el primer estudio que analiza el efecto del Q10 sobre la actividad de las enzimas antioxidantes presentes en el plasma seminal: catalasa, superóxidodismutasa (SOD) y 8-isoprostano, consideradas biomarcadores del estrés oxidativo en plasma seminal.

Completaron el estudio randomizado y doble ciego, 47 varones iraníes infértiles (23 con Q10 y 24 placebo). La dosis de Q10 fue 200 mg/día durante 3 meses. Sus resultados indican que con Q10 hay una superior actividad catalasa y SOD que con placebo.

Hubo una significativa correlación positiva entre la concentración de Q10 y la morfología espermática normal ($p=0.037$), actividad catalasa ($p=0.041$), y SOD ($p<0.001$). Sin embargo, tras 3 meses de suplementación, solo se observó tendencia a aumentar la motilidad, pero no hubo ningún cambio significativo, ni en concentración, motilidad ni en morfología.

4. Morgante y cols en 2010 (99) realizaron en Italia un estudio bien diseñado, controlado y randomizado, en una población de 180 varones estériles con astenospermia idiopática, comparando antioxidantes combinados con un control de no tratamiento. Edad entre 25 y 49 años.

Características seminales: concentración <20 M/ml, motilidad progresiva $<30\%$ y morfología normal $<30\%$. Randomizaron 2 grupos : uno con L-arginina 1660

Resultados a debatir con otros investigadores

mg + carnitina 150 mg + acetylcarnitina 50 mg + ginseng 200 mg, en 90 pacientes, y otro, no tratamiento, también con 90 pacientes. El tratamiento duró 3 meses. Su objetivo fue analizar parámetros seminales y grado de satisfacción sexual.

Concluyen que los antioxidantes combinados mejoran significativamente la motilidad espermática a los 3 meses de tratamiento, así como el grado de satisfacción sexual.

Como se puede comprobar, a pesar del buen diseño metodológico de los tres estudios anteriores, analizando Q10 vs placebo, y del comparativo de combinados vs no tratamiento, los resultados son contradictorios.

Dos estudios observaron mejora significativa en la concentración y en la motilidad, pero en los otros dos estudios estos hallazgos no se observaron, incluso fueron totalmente contrarios.

En nuestro estudio, en varones con astenospermia idiopática leve o severa que precisaban de TRA, ningún tratamiento ha sido efectivo en mejorar la concentración espermática, que incluso disminuyó, aunque no significativamente en los tres grupos (control, antioxidante único y combinados), y este efecto fue independiente de los días de tratamiento y de la edad del paciente.

Respecto a la motilidad espermática, aumentó significativamente en los dos grupos de antioxidantes después del tratamiento, siendo el incremento mayor en el grupo de antioxidantes combinados, pero no hay un tratamiento antioxidante que sea significativamente superior al otro, respecto a mejorar la motilidad.

Por otra parte, este aumento de la motilidad observado en ambos grupos, tampoco se debe al número de días de tratamiento ni a la edad del paciente .

2.1.1.1. DISCUSION CON AUTORES QUE SOLO ANALIZAN CAMBIOS SEMINALES UTILIZANDO UNICAMENTE ÁCIDO GRASO OMEGA 3 (DHA)

En nuestra investigación, el ácido graso omega 3 DHA, ha constituido uno de los grupos de estudio, el grupo denominado antioxidante único.

Valorar los resultados que aporta un único antioxidante, comparándolo con otros antioxidantes combinados, ha sido uno de los principales objetivos de esta investigación, y más al ser uno de los antioxidantes comercializados más recientes y con menos información de sus resultados sobre la calidad seminal y sobre todo, sobre resultados gestacionales, existentes en la literatura.

En estudios de experimentación animal realizados en ratas incapaces de sintetizar ácidos grasos insaturados (DHA y ácido araquidónico), la administración en la dieta de DHA, restaura la espermatogénesis y la fertilidad, aunque el mecanismo por el que se consigue, no está completamente aclarado (109).

1. Conquer y cols (110) publicaron hace ya 15 años en la revista *Lipids*, un estudio muy interesante para nosotros, realizado en Ontario (Canada), analizando los efectos que la suplementación oral con ácido graso omega 3 DHA, puede tener en varones astenozoospermicos (para ellos, motilidad <50%).

Analizaron únicamente a 28 varones astenoospermicos, randomizándolos en 3 grupos: placebo (n=9), DHA 400mgs/día (n=9), y DHA 800 mgs/día (n=10), con una duración de 3 meses. Tamaño muestral muy pequeño para establecer conclusiones válidas.

Determinaron: niveles de DHA en suero, plasma seminal y espermatozoide, estudiando también, la motilidad espermática antes y después de la suplementación.

Sus resultados indicaron que la suplementación con DHA aumenta su concentración, tanto en plasma sanguíneo como en plasma seminal, en varones astenoospermicos, incluso siendo muy superiores a las observados en

varones normozoospermicos, pero este incremento no tiene ningún efecto en aumentar el DHA en el interior del espermatozoide.

Es como si el espermatozoide fuera incapaz de incorporar esta forma de DHA a su membrana de fosfolípidos. Probablemente, este nulo efecto en la membrana espermática de varones astenospermicos, explique el porqué de que no hubo ningún efecto significativo en aumentar la motilidad tras DHA en estos varones, aunque si se observa una tendencia a aumentar, tanto tras 400 como 800mgs/día de DHA.

Así, respecto a los parámetros seminales, no se observó ningún efecto significativo, ni en la concentración ni en la motilidad: (concentración 400mg DHA: pre 31.6 (9.8) vs pos 37.8 (12.3) M/mL, $p>0.05$; concentración 800mg DHA: pre 57.0 (17.6) vs pos 44.6 (13.0) M/mL, $p>0.05$). Motilidad 400mg DHA: pre 26.7 (4.2) vs post 39.4 (8.1) %, $p>0.05$). Motilidad 800mg DHA: pre 25.3 (4.5) vs 32.0 (5.1) %, $p>0.05$.

Nuestros resultados con DHA son similares a los anteriores, incluso mejores, obtenidos de un tamaño muestral muy superior, pues el aumento de la motilidad progresiva observada tras tratamiento, es significativa y no depende de los días de tratamiento ni de la edad del paciente.

2. Conquer y cols (110) ya demostraron en 1999, que los espermatozoides de hombres astenospermicos tienen menor concentración de DHA que en normozoospermicos, y superior de ácido oleico.

3. Safarinejad (37) en 2010, también observó que, los hombres fértiles tienen superiores concentraciones de omega 3 tanto en sangre como en el espermatozoide, comparados con estériles.

4. Safarinejad (111) en 2011, en un ensayo clínico randomizado realizado con 238 varones infértiles con OAT idiopática, comparando EPA mas DHA 1,84 gr/día vs placebo durante 32 semanas, observó una significativa mejoría en la concentración espermática y en su densidad celular, en el grupo omega-3, atribuida a su potente actividad antioxidante.

5. Alvarez, investigador español con gran experiencia en ácidos grasos omega 3 DHA, realizó en 2011 (31) un estudio, en 80 pacientes diagnosticados de necrozoospermia, describiendo 2 grupos: un primer grupo con 40 varones con baja viabilidad espermática (<75%) y un segundo grupo, con 40 varones con alta fragmentación de DNA (>20%).

En ambos grupos, 20 pacientes fueron tratados con ácido docohexanoico (DHA) 200mg cada 12 horas y otros 20 no recibieron tratamiento alguno.

El DHA que se utilizó estaba comercializado con el registro Gesta DHA (Gynea Laboratorios), procedente de microalgas marinas. El estudio duró 8 semanas.

Recogieron muestras seminales a las 0,1,2,4 y 8 semanas para su análisis, en el grupo Gesta DHA y en el grupo no tratamiento.

Su objetivo fue: analizar viabilidad espermática y fragmentación de DNA.

Respecto a la viabilidad, observaron un significativo incremento ($p < 0.01$) ya en la primera semana, que fue ascendiendo, alcanzando un máximo a la 8 semana, comparado con el grupo control: basal, control 65% y DHA 66%; a la 1 semana, control 65% y DHA 80%; a la 8 semana control 68% y DHA 92%.

Respecto a la fragmentación hubo una significativa reducción ($p < 0.01$) en el grupo DHA ya en la primera semana, alcanzando el máximo en la 8 semana.

Su hallazgo más importante fue la eficacia del DHA en la prevención del daño de membrana, expresada como viabilidad espermática, y de la fragmentación del DNA.

Es el primer trabajo observacional demostrando la utilidad del DHA en el tratamiento de la esterilidad masculina debida a alteraciones de la membrana y daño del DNA.

Un dato interesante de su estudio fue el factor tiempo de tratamiento. Con tan sólo 1 semana de tratamiento, ya se observó mejoría significativa en la calidad espermática.

Resultados a debatir con otros investigadores

Lo explican comentando que el daño de membrana y del DNA de espermatozoides eyaculados, se produce sobre todo en el epidídimo, y su tránsito por él se estima en 4-7 días.

Otro aspecto interesante fue no observar efectos adversos debidos al DHA, lo cual era lógico de observar debido a que el DHA procede de microalgas obtenidas en cultivos aislados del entorno marino.

En sus conclusiones, no recomiendan asociar DHA y EPA (aceites de pescado) o ácido linoleico, ya que podrían interferir el efecto antiinflamatorio del DHA.

Además, comentan que el aceite de pescado puede contener trazas de metales pesados que actúen como catalizadores de reacciones mediadas por radicales libres.

Terminan defendiendo la utilización de Gesta DHA como tratamiento preventivo del daño postesticular, tanto en parejas que van a realizar coitos dirigidos como en parejas que van a realizar TRA.

Nuestros resultados con el mismo DHA y a la misma dosis (400 mgrs/día), son similares a los anteriores, incluso mejores, pues el aumento de la motilidad progresiva observada tras tratamiento, es significativa y no depende de los días de tratamiento ni de la edad del paciente

6. Martínez-Soto y cols en 2011 (96), publicaron un estudio randomizado por computador y doble ciego, realizado en IVI Murcia, España, cuyo objetivo fue evaluar el efecto que la suplementación de la dieta a varones con muy alta dosis de DHA, tiene sobre la calidad espermática, capacidad antioxidante y fragmentación de DNA.

Los varones tenían alteración seminal según criterios OMS y acudieron a una clínica de esterilidad. Excluyeron a aquellos varones con enfermedades metabólicas, genéticas, oncológicas y en tratamiento con anticoagulantes.

El estudio se realizó en 120 varones durante 10 semanas, randomizando dos grupos: DHA 1500 mg/día vs placebo. La edad media fue de 35 años.

Las mediciones de éxito primario fueron:

Discusión

- los parámetros seminales: concentración espermática, motilidad, y morfología.
- la medición de la capacidad antioxidante total del DHA valorada por un análisis colorimétrico del plasma seminal.
- valorar la fragmentación del DNA (Test del Túnel) medida por citometría de flujo.
- medición de ácidos grasos en plasma seminal y en espermatozoides por cromatografía de gases.

Las mediciones de éxito secundario fueron:

- número de espermatozoides totales en eyaculado.
- volumen de eyaculado.
- viabilidad espermática (% espermatozoides sin daño de membrana).

Sus resultados más significativos fueron una mejoría en la fragmentación del DNA en el grupo de DHA.

7. Attaman y cols (112) en 2012, evaluaron la relación entre la ingestión de ácidos grasos con la alimentación y la calidad seminal en 99 varones. Concluyeron que a mayor ingestión de omega-3, mejor morfología espermática.

8. Safarinejad y cols publican en 2012 (36), el papel que los ácidos grasos omega 3 y omega 6, pueden ejercer en la astenospermia idiopática, objeto de esta tesis, comentando que, los ácidos grasos omega 3, se encuentran en algunos alimentos y son beneficiosos para la salud.

Su suplementación provoca una potente acción antioxidante en el líquido seminal, aumentando la concentración espermática, la motilidad y la morfología normal.

La esterilidad causada por el síndrome de astenospermia idiopática, constituye uno de los grupos de pacientes más frecuentes en la práctica clínica diaria del andrólogo.

Resultados a debatir con otros investigadores

Hay tres tipos principales de ácidos grasos naturales: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Estos últimos son esenciales porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano.

El DHA, el EPA y el ácido linoleico, son los principales ácidos poliinsaturados omega 3. El primer mecanismo por el que estas sustancias afectan a la espermatogénesis es al introducirse en el interior de la membrana celular del espermatozoide.

El éxito de la fertilización del ovocito depende de estos lípidos de la membrana celular.

Concluye que los omega-3 tienen un excelente perfil de seguridad carentes de efectos adversos, son costo efectivos, con efectos beneficiosos sobre la espermatogénesis en humanos, y deben ser considerados como un suplemento nutricional que mejora la calidad seminal.

Ellos tratan frecuentemente a varones infértiles con OAT idiopática que son candidatos para reproducción asistida, con estos suplementos.

9. Anarte y cols (113) del grupo Quirón Bilbao, realizaron con DHA un estudio prospectivo, randomizado y doble ciego, analizando si la suplementación de la dieta con ácidos grasos DHA puede mejorar la composición de ácidos grasos de la membrana espermática y a su vez, la calidad seminal, comparando donantes de semen con varones con seminograma alterado.

Concluyeron que el DHA no produce efectos adversos y mejora la calidad seminal, por lo que su suplementación puede ser beneficiosa en ciertos varones subfértiles, administrado antes de realizar las TRA. Refieren que son necesarios estudios con otras dosis y mayor tiempo de tratamiento.

10. Anarte y cols, en 2013 (113), comunicaron en un suplemento de la revista *Fertility and Sterility*, un análisis del DHA (concretamente, Gesta DHA), a dosis de 800 mgrs/día administrado durante 10 semanas, a 86 pacientes con seminograma alterado, comparándolo con un grupo control de 29 varones donantes de semen.

Mejóro la calidad seminal con DHA respecto a la vitalidad y la morfología, que fue similar a la de 29 varones donantes de semen no tratados con DHA, pero no observaron diferencias significativas en el resto de parámetros seminales (concentración y motilidad).

Compararon tres grupos: placebo, 400 mgrs/día DHA y 800 mgrs/día DHA.

Nuestros resultados comparando DHA con no tratamiento, observamos una disminución no significativa en la concentración espermática similar en ambos grupos. En cambio, la motilidad progresiva si aumentó pero de modo similar en ambos grupos.

11. Bermejo-Bescós lidera un grupo de investigadores farmacólogos, que realizaron su estudio en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y lo publicaron muy recientemente, en 2014 (114).

Es un trabajo muy interesante para evaluar nuestros resultados seminales y gestacionales, ya que ellos estudian lo que sucede a nivel *in vitro*, cuando se utilizan antioxidantes.

Evalúan la actividad antioxidante de 5 suplementos dietéticos comerciales, entre ellos, los antioxidantes utilizados en nuestro estudio: GestaDHA y Andromás.

Utilizaron dos técnicas diferentes estandarizadas en la literatura para determinar la actividad antioxidante:

- a) Ensayo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), basado en la transferencia de electrones. Método de generación de radicales peroxilo, que simula las reacciones de los antioxidantes con los lípidos en sistemas fisiológicos,
- b) Ensayo DPPH (Actividad Captadora del Radical difenilpicril-hidrazil), basado en la transferencia de un átomo de hidrógeno, de acuerdo con las recomendaciones del IUPAC *Technical Report*.

Resultados a debatir con otros investigadores

Los datos se obtuvieron de dos lotes diferentes (n=5 por lote). Sus resultados fueron muy favorables para los antioxidantes combinados, sobre todo Andromás.

El suplemento Andromás mostró una actividad antioxidante significativa ($p < 0.05$) en el ensayo ORAC con índices ORAC de 0.24 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ suplemento, valor considerado en la literatura como muy antioxidante.

El más antioxidante fue el Andromás (0.24) y el menos, Gesta DHA (0.12), con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.05$).

Respecto a la valoración por el método DPPH, Andromás fue de nuevo el más antioxidante comparando con un control. Gesta DHA no presentó actividad captadora de este radical.

Este estudio es el primero en evaluar la actividad antioxidante de estos preparados comerciales, que fue muy elevada para antioxidantes combinados (Andromás y Seidiferti), y menos elevada para el antioxidante único Gesta DHA.

Los autores concluyen que hay una necesidad emergente de realizar estudios clínicos controlados y randomizados, que puedan poner de manifiesto la eficacia clínica de estos suplementos nutricionales sobre la fertilidad masculina.

Con nuestro estudio, hemos intentado colaborar en esta línea de investigación clínicamente, y comprobar todas las posibles consecuencias seminales y gestacionales de estos hallazgos interesantísimos, observados in vitro.

Coincidimos plenamente en nuestros resultados clínicos, con los hallazgos observados in vitro, por este grupo investigador. La motilidad, que puede ser la expresión máxima de la acción antioxidante sobre el espermatozoide, fue superior tras tratamiento con Andromás respecto a Gesta DHA, tanto en varones con astenospermia leve como severa.

2.1.2. DISCUSIÓN CON AUTORES QUE ANALIZAN CAMBIOS SEMINALES Y GESTACIONALES

Hemos seleccionado, leído y estudiado detenidamente, 15 publicaciones de antioxidantes en varones subfértiles, que expresan sus resultados analizando posibles cambios en los parámetros seminales y describiendo los *embarazos espontáneos* observados durante el tratamiento.

Los hemos ordenado por antigüedad, desde el primero en 1996 al último en 2015.

Las conclusiones ni mucho menos son unánimes, pero se observa en estos estudios, una tendencia a una mejoría de resultados clínicos y seminales con antioxidantes en general.

Respecto a los parámetros seminales, los autores de 11 trabajos observaron un aumento de la motilidad (73.3% de los trabajos) y en solo 4 no describen mejoría (26.7%).

Respecto a los embarazos espontáneos, en 9 publicaciones se observó un aumento en el número de gestaciones (60%), y en 6 (40%), no lo observan.

Análisis y comentarios sobre estos trabajos:

1. Suleiman y cols, en 1996 (64), hace ya 20 años, publicaron un estudio prospectivo, randomizado con placebo, doble ciego, realizado en 87 varones astenospérmicos (para ellos, motilidad inferior o igual al 40%).

Ellos randomizaron (no indican el método), dos grupos de pacientes: 52 varones que tomaron vitamina E 100mg tres veces al día, y 35 varones que tomaron placebo tres veces al día.

La edad media en el grupo vitamina E fue de 34.8 años y en el grupo placebo 33.2 años.

Todos acudían a un centro de fertilidad de Arabia Saudí, sus mujeres no tenían ninguna anomalía, y todos buscaban embarazo, pero sin aplicar TRA.

Resultados a debatir con otros investigadores

Todas las muestras seminales se estudiaron por microscopía para valorar calidad espermática, antes y después del tratamiento.

También se estudió en espermatozoides y en plasma seminal el nivel de peroxidación lipídica determinando malondilaldehído (MDA), antes y mensualmente, durante el tratamiento.

Los objetivos del estudio fueron:

a) valorar el nivel de peroxidación lipídica en el semen de pacientes astenospérmicos y su posible correlación con la motilidad espermática.

b) determinar si la vitamina E influye en el grado de peroxidación, mejorando la motilidad espermática y aumentando la tasa de embarazo espontáneo.

Consideraron que las muestras de semen mejoraban si tras tratamiento, la motilidad aumentaba un 15% o más, respecto a las muestras basales.

Sus resultados indicaron que la motilidad disminuía significativamente cuando la concentración de MDA espermático ascendía ($p < 0.001$).

Comparando con pacientes normoespérmicos, la concentración de MDA fue 1.7 veces superior en varones astenospérmicos. Al tratar con vitamina E a los astenospérmicos, se les reducía la concentración de MDA y mejoraba su motilidad de modo significativo.

Respecto a la tasa de embarazo, hubo 11 gestaciones espontáneas en los 52 varones tratados con vitamina E, (tasa del 21%), con una duración de tratamiento entre 2 y 6 meses (media de tratamiento para quedar gestante, 4.2 meses).

En este grupo de varones que consiguieron embarazo, la concentración de MDA disminuyó tras el tratamiento de un inicio de $9.1 \pm 1.6 \times 10^{-1}$ a $4.4 \pm 0.6 \times 10^{-1}$ ($p < 0.001$), y la motilidad espermática ascendió, desde una inicial de 32.5 ± 8.7 %, a una final de 60.1 ± 6.5 % ($p < 0.001$).

Nueve embarazos llegaron a término con nacido vivo sano y dos finalizaron en aborto.

Ninguna mujer de los 35 varones que tomaron placebo, consiguieron embarazo tras 6 meses de seguimiento.

Concluyeron que la vitamina E, puede proteger la pérdida de motilidad espermática debida a la reducción en la peroxidación lipídica, protegiendo al espermatozoide y aumentando la probabilidad de embarazo espontáneo.

Tras finalizar el estudio, de los 11 varones que alcanzaron embarazo, tres desearon buscar un segundo niño. Volvieron a tomar vitamina E y volvieron a repetir embarazo.

También fuera de estudio, de los varones placebo, 26 tomaron vitamina E y 4 alcanzaron embarazo.

Muy interesante este estudio, que ya indicó hace muchos años, que los antioxidantes (en este caso la vitamina E), pueden mejorar la calidad seminal y la tasa de embarazo espontáneo.

2. Scott y cols (69) publicaron hace también bastante tiempo, en 1998, un estudio comparativo, muy bien diseñado, entre dos grupos de antioxidantes (único, selenio vs combinados, selenio, vitaminas A, C, E, y grupo control, placebo), randomizado y doble ciego, realizado en Glasgow, en 69 varones que consultaban en una clínica de fertilidad por baja motilidad espermática.

La edad media del grupo fue de 33.3 años y la duración del estudio fue de 3 meses y 2 semanas.

Se randomizaron tres grupos: antioxidante único, Selenio 100ug/día (n=16) vs antioxidantes combinados, Selenio 100ug/día + Vitamina A 1mg + Vitamina C 1 mg + Vitamina E 15mg/día, (n=30) vs placebo (n=18).

El objetivo primario del estudio fue valorar cambios en los parámetros seminales, y el secundario, la tasa de embarazo espontáneo.

Observaron en los grupos de antioxidante único y combinados, una mejoría, tanto en la motilidad espermática a los 3 meses de tratamiento como en tasa de embarazo, comparado con placebo.

Resultados a debatir con otros investigadores

Obtuvieron 5 embarazos espontáneos en los dos grupos de tratamiento y ninguno en el grupo placebo.

Es llamativo que estos resultados, observados hace ya 18 años, sean confirmados en 2015, con muchos más casos, con otros antioxidantes y en parejas que se someten a diversas Técnicas de Reproducción Asistida.

3. Un año después, en 1999, Rolf y cols (68), realizan un estudio también muy bien diseñado, comparativo entre dos antioxidantes, unicéntrico, doble ciego, controlado con placebo y randomizado.

Las parejas tenían esterilidad mayor de un año, debida a una astenospermia y/o oligospermia moderada.

31 pacientes completaron el estudio: 15 tomaron vitaminas y 16 placebo. Las dosis fueron elevadas: 1000mg de vitamina C + 800mg de vitamina E al día. El tiempo corto, 2 meses.

No observaron ningún cambio en los parámetros seminales tras el tratamiento antioxidante, ni comparando los antioxidantes con el placebo: grupo vitaminas, motilidad progresiva antes y después ($36.3 \pm 9.6\%$ vs $34.1 \pm 11.8\%$, NS); grupo vitaminas, concentración espermática antes y después (18.1 ± 7.0 M/ml vs 20.6 ± 13.5 M/ml, NS).

Diferenciaron dos subgrupos, fumadores y no fumadores, y tampoco observaron diferencias.

Ningún efecto adverso fue mencionado y ningún embarazo se inició durante los 2 meses del estudio en ningún grupo.

Respecto al corto periodo de tiempo que duró el estudio, los autores piensan que puede justificar el no observar cambios seminales, pero citan trabajos previos de Lenzi 1993 que observó mejoría en la motilidad espermática con tan sólo 4 semanas de tratamiento antioxidante con glutatión. También Dawson 1987 y 1992, observó mejoría en la calidad espermática con tan sólo unos días de tratamiento con vitamina C.

4. Lenzi y cols publican en 2004 (89), un estudio bien diseñado de 60 parejas estériles, con oligo-asteno-teratozoospermia, randomizado con placebo (30 varones vs 30 varones), utilizando como tratamiento antioxidante, carnitinas, durante 6 meses.

Las dosis fueron de L-carnitina, 2g/día y de L-acetil-carnitina, 500mg/12 horas. Los parámetros seminales se analizaron por microscopía.

El grado de cumplimiento y los posibles efectos adversos también fueron evaluados, incluso realizando una analítica de sangre general.

Los varones tenían una edad entre 20 y 40 años y una esterilidad superior a 2 años. La pareja femenina tenía un estudio de fertilidad normal.

Los pacientes siguieron una dieta alimenticia *standard* durante el tratamiento. Había pacientes con leve oligoastenospermia y otros con severa astenospermia.

Sus resultados fueron interesantes: cuando compararon tanto la concentración como la motilidad progresiva en todos los pacientes tratados con carnitinas, observaron a los 6 meses, una mejoría, pero no significativa (concentración antes y a los 6 meses: 18.07 ± 5.68 M/ml vs 22.09 ± 9.05 M/ml, $p > .05$; motilidad progresiva antes y a los 6 meses: $14.83 \pm 5.17\%$ vs $25.00 \pm 13.06\%$, $p > .05$).

Esta mejoría, también se observó en el grupo placebo, pero no fue significativo, comentando la importancia de los factores psicológicos, incluso en reproducción.

Cuando subdividieron los grupos en función de la gravedad de la astenospermia, si que encontraron diferencias significativas, con una mejoría evidente de la movilidad a los 6 meses, en el grupo que tenía una astenospermia severa ($< 5M$ de espermatozoides móviles por eyaculado): antes 3.4 ± 1.9 M/ml y a los 6 meses, 6.9 ± 3.2 M/ml, $p = .038$. Esta mejoría significativa, también se observó en el grupo placebo.

En cuanto a gestaciones, informan que, aunque no fue objetivo del estudio en su análisis, observaron 4 embarazos espontáneos y todos en el grupo

Resultados a debatir con otros investigadores

carnitinas y después de 4 meses de tratamiento. Ninguno de estos varones tuvo una significativa mejoría en sus parámetros seminales.

Ellos sugieren que el tratamiento combinado de carnitinas más de 4 meses, puede mejorar la función espermática y su capacidad de fertilización, aunque no se objetive en el análisis microscópico seminal.

Esta terapia puede actuar directamente sobre la maduración y metabolismo energético del espermatozoide, a través de mejorar el medio-ambiente epidídimo-testicular.

Concluyen sugiriendo que se estudien estos tratamientos en pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida, que es exactamente lo que hemos realizado en nuestro estudio.

5. Cavallini y cols (74), realizan un estudio comparativo entre antioxidantes combinados.

Su diseño es metodológicamente complejo, pues incluyen varones estériles con OAT idiopática y con varicocele en sus diferentes grados (I a V). Mezclan los tratamientos antioxidantes con antiinflamatorios.

Randomizan tres grupos, todos con pacientes unos de OAT y otros con varicocele de diferentes intensidad.

Diseñan tres grupos de tratamiento: A) placebo, B) L-carnitina 2g/día + acetil-L-carnitina 1 g/día, y C) L-carnitina + acetil-L-carnitina 1g/día + cinoxican (antiinflamatorio no esteroideo).

El tratamiento duró 6 meses. Incluyeron un total de 325 varones entre OAT y varicoceles.

Su objetivo primario fue, estudiar efectos adversos y parámetros seminales (concentración, motilidad y morfología). Como secundarios, tasa de embarazo espontáneo por test B-hCG +.

Sus resultados fueron: en el grupo placebo no hubo ningún cambio en los parámetros seminales. En el resto de grupos si hubo un significativo incremento tanto en la concentración como en la motilidad y en la morfología,

que se detecto a los 3 meses y se mantuvo a los 6 meses. Cuando se comparó las carnitinas vs carnitinas + antiinflamatorio, todos los parámetros seminales fueron significativamente superiores al asociar el antiinflamatorio .

Los efectos adversos fueron leves y escasos: en 7 pacientes se observó euforia y en 6 epigastralgia y nauseas.

Respecto a los embarazos espontáneos, hubo más embarazos en el grupo antiinflamatorio, seguido de las carnitinas solas y en último lugar el placebo ($p < .05$). Concretamente, el grado de embarazo por pareja/mes fue 0.3% en el placebo, 3.6% en carnitinas solas y 6.3% con antiinflamatorios.

6. Balercia y cols (73) publicaron en *Fertility and Sterility* en 2005, un estudio randomizado doble ciego, realizado en Italia.

Los varones fueron reclutados en una clínica andrológica por esterilidad superior a 2 años. La edad osciló entre 24 y 38 años. Fueron diagnosticados de astenospermia (motilidad $< 50\%$) de causa idiopática. Estudio de fertilidad de la mujer normal.

El estudio se realizó con 60 varones durante 6 meses de tratamiento, randomizando 4 grupos:

- L-carnitina 3g/día oral (n=15)
- L-acetylcarnitina 3g/día oral (n=15)
- L-carnitina 2g/día + L-acetylcarnitina 1g/día (n=15)
- Placebo (n=15)

Consideraron como objetivo primario analizar los parámetros seminales pero en los resultados mencionan número de embarazos espontáneos.

Realizan un estudio comparativo con placebo y entre antioxidantes carnitinas entre si y a diferentes dosis.

Concluyeron que hay una mejoría en la motilidad solo en el grupo de la L-acetylcarnitina.

Resultados a debatir con otros investigadores

Respecto a embarazos espontáneos, se produjeron 3 en el grupo placebo, 5 en el grupo de las dos carnitinas, 2 con L-carnitina y 2 con L-acetylcarnitina. Se desconoce si fueron embarazos bioquímicos o clínicos.

7. Balercia y cols 4 años después (115), volvieron a diseñar un estudio similar, pero solo con un antioxidante, la coenzima Q10, comparándolo con placebo.

Se trata de un estudio controlado, randomizado, doble ciego, realizado también en Italia, en varones estériles de más de 2 años diagnosticados de astenozoospermia idiopática, con estudio de fertilidad de la mujer normal.

Dos grupos randomizados (no indican el método): 28 varones tomaron CoQ10 a dosis de 100mg cada 12 horas durante 6 meses, y otros 27 varones tomaron placebo durante 6 meses.

Determinaron como objetivos: variaciones en los parámetros seminales y variaciones en las concentraciones de CoQ10 y su forma activa (ubiquinol) en plasma seminal y en el propio espermatozoide.

Consideraron a la motilidad espermática como el principal medidor de eficacia del tratamiento.

Análisis seminales realizaron 1 mes antes, basal, 3 y 6 meses de tratamiento, y 3 meses postratamiento. Siguieron los criterios OMS de 1999 para valorar la motilidad.

También valoraron efectos adversos y mencionaron embarazos, aunque nunca fue objetivo del estudio.

A los varones se les advirtió que siguieran una dieta alimenticia habitual durante el estudio.

Los análisis seminales fueron realizados siempre por el mismo biólogo y también por un sistema computarizado.

Sus resultados indicaron una mejoría significativa en la motilidad total A + B, como en la motilidad progresiva A, en el grupo Q10 respecto a placebo. Grupo Q10: Motilidad A + B, antes $33.14 \pm 7.12\%$ y a los 6 meses $39.41 \pm 6.8\%$,

Discusión

$p < .0001$; Motilidad A, antes $10.43 \pm 3.52\%$ y a los 6 meses $15.11 \pm 7.34\%$, $p < .0003$.

Interesante en este estudio fue observar que, 3 meses después de finalizar la toma de Q10, la motilidad volvió a los niveles previos al inicio del estudio. En el grupo placebo no se observó ninguna diferencia significativa en ningún parámetro cinético.

Respecto a la tasa de embarazo, en los 55 casos hubo 9 embarazos espontáneos durante el tratamiento, 6 en el grupo Q10 (de 28) y 3 en el placebo (de 27). De los 6 embarazos observados en el grupo Q10, se consiguieron 3, después de 4 meses, 1 después de 5 meses y 1 después de 6 meses.

No hubo efectos adversos. Sugieren que el CoQ10 actúa en la cadena respiratoria mitocondrial con una acción antioxidante.

8. Sigman y cols (116) realizaron un estudio prospectivo, controlado, randomizado con placebo, doble ciego, realizado en Minesota, con el propósito de determinar si la suplementación oral con carnitina a varones con astenospermia idiopática (motilidad entre el 10 y el 50%), mejora la calidad espermática tras 6 meses de tratamiento.

Aunque la valoración de la tasa de embarazo no fue considerada como objetivo de éxito primario, registraron todos los embarazos conseguidos durante el estudio.

El tamaño muestral fue pequeño: solo 21 pacientes completaron el estudio, 12 tratados con carnitina vs 9 placebo, con una edad media de 36.2 ± 1.7 años vs 35.3 ± 2.5 años.

Los autores en la discusión enfatizan en que en América, es muy difícil encontrar pacientes que quieran participar en estudios controlados con placebo.

La carnitina administrada fue en cápsulas con 1.000mg de L-carnitina mas 500mg de L-acetilcarnitina.

Resultados a debatir con otros investigadores

Utilizaron dos muestras seminales: en una realizaron mediciones de L-carnitina y acetil-carnitina en el propio espermatozoide y en el plasma seminal por cromatografía líquida, y en la otra evaluaron motilidad y conteo espermático.

Esto lo hicieron en 3 ocasiones: al inicio antes del tratamiento, a las 12 semanas y a las 24 semanas de tratamiento.

Sus resultados no observaron mejoría significativa en ningún parámetro respecto al placebo. Curiosamente, observaron una tendencia no significativa a mejoría, tanto en la motilidad como en el conteo de espermatozoides con el tiempo, pero fue incluso superior en el grupo placebo.

Tampoco hubo incremento de acetil-carnitina o L-carnitina en plasma seminal o en el propio espermatozoide tras 24 semanas de tratamiento.

Respecto a la tasa de embarazo, hubo un embarazo tras FIV en el grupo de carnitina y otro embarazo espontáneo en el grupo placebo. No hubo efecto adverso alguno.

9. Ghanem y cols publicaron en 2010 (117), un estudio randomizado con placebo, realizado en 60 varones: 30 varones con OAT idiopática, administrando al grupo de estudio, citrato de clomifeno 25mg/día + vitamina E 400mg/día, durante 6 meses y otros 30 varones con placebo.

En su diseño mezclan sustancias antioxidantes como la vitamina E con sustancias de mecanismo de acción hormonal (antiestrógeno) como es el clomifeno.

En el grupo de estudio, mejoraron tras tratamiento significativamente, los parámetros seminales: la concentración ascendió de 10.2 ± 4.14 M/ml a 18 ± 15 M/ml ($p=0.0025$), y la motilidad ascendió desde un $4 \pm 6\%$ a un $7 \pm 10\%$ ($p=0.0286$).

Respecto a la tasa de embarazo espontáneo, también aumentó significativamente: grupo de estudio 36.7% vs placebo 13.3%, ($p=0.037$).

10. Wang y cols (118), estudiaron comparativo dos grupos de antioxidantes: único a base de vitamina E y combinados a base de vitamina E más L-carnitina.

Analizaron a 135 varones con astenospermia idiopática: 68 tratados con L-carnitina 2 g/día más vitamina E y 67 varones tratados únicamente con vitamina E, durante 3 meses.

Sus resultados fueron mejores con antioxidantes combinados respecto a la motilidad progresiva, que ascendió desde $28.6 \pm 9.2\%$ a $45.4 \pm 11.1\%$, $p < 0.01$. Los cambios en la concentración y la morfología no fueron significativos.

La tasa de embarazo espontáneo fue significativamente superior con los combinados (31.1%) respecto al grupo único (3.8%), $p < 0.01$.

11. Busetto y cols (119), analizaron la utilización de muchos antioxidantes, juntos y combinados, concretamente: carnitina 145mg + acetil-carnitina 64mg + fructosa 250mg + vitamina C 50mg + selenio 50ug + CoQ10 20mg + zinc 10mg + ácido cítrico 50mg + cianocobalamina 1,5ug + ácido fólico 200mcg, una vez al día durante 4 meses.

Finalizan el estudio 96 varones con AT idiopática. No tienen grupo control.

Sus resultados observan un significativo aumento de la motilidad progresiva media que ascendió de $18.3 \pm 3.8\%$ a $42.1 \pm 5.5\%$ ($p < 0.05$). La concentración y la morfología no tuvieron cambios significativos.

Respecto a embarazos solo mencionan que de las 96 parejas estudiadas, durante los 4 meses de estudio, hubo 16 embarazos espontáneos (tasa de embarazo de 16.6%). No mencionan tasa de aborto.

12. Safarinejad en el año 2012 (36) publica un estudio realizado en 287 varones con OAT idiopática, comparando Q10 con placebo. La dosis de Q10 fue de 300mg oral dos veces al día durante 12 meses.

Observaron en sus resultados una mejora significativa tras el antioxidante en todos los parámetros seminales: la concentración espermática subió un 113.7%, la motilidad progresiva un 104.8% y la morfología un 78.9% ($p < 0.05$).

Resultados a debatir con otros investigadores

Respecto a las gestaciones, describen una tasa de embarazo espontáneo del 34.1% tras 8.4±4.7 meses de tratamiento, mejoría no significativa.

13. Abad y cols publican en 2013 (120) en *Andrology*, un análisis observacional no comparativo, realizado en el servicio de Urología del Hospital de Sabadell en España.

Estudian a un grupo de 20 varones estériles con astenoteratospermia de causas no bien definidas.

Les administraron durante 3 meses un preparado comercializado de antioxidantes combinados llamado Androferti, que contiene: L-carnitina 1500mg, vitamina C 60mg, coenzima Q10 20mg, vitamina E 10mg, vitamina B9 200ug, vitamina B12 1ug, Zinc 10mg y Selenio 50ug. No especifican dosis/día.

Su objetivo primario fue estudiar si mejora la fragmentación del DNA tras el tratamiento, y secundariamente, los parámetros seminales y tasa de embarazo.

Respecto a los parámetros seminales utilizaron los antiguos criterios de la OMS de 1999, aunque el trabajo fue realizado durante los años 2010 y 2011. Su valoración fue automatizada.

Observaron una mejoría significativa en la concentración y en la motilidad tipo A y tipo A + B tras el tratamiento. Motilidad A: antes 13.54±9.57 % vs después 20.02±12.33%, $p = 0.02$. Motilidad A + B: antes 28.94±19.93 vs 37.59 ± 16.44%, $p = 0.04$.

Respecto a la concentración, aunque refieren mejoría significativa, se desprenden dudas al analizar sus tabla: antes 69.75±44.08, después 69.85±50.55 M/ml, $p=0.042$, pues parece no existir diferencias apreciables.

Mencionan datos de la tasa de embarazo tras antioxidantes: 4 parejas de 20, quedaron gestantes a los 3 meses de tratamiento (tasa de embarazo espontáneo del 15%).

Son unos resultados muy discutibles pues: no hay grupo control, son solo 20 parejas, no definen estudios de esterilidad realizados a la mujer, y el embarazo no era objetivo del estudio.

Realizan un comentario respecto a los resultados gestacionales interesante, consecuencia de sus resultados observados sobre la mejoría en la fragmentación del DNA, tras antioxidantes.

Expresan que hay que investigar si con estos suplementos nutricionales mejoran las tasas de embarazo y de nacidos, pues puede ser consecuencia directa de la mejoría observada previamente en la fragmentación del DNA.

Concluyen en que, hay que realizar estudios que investiguen que tipo de antioxidante es el más adecuado, en cuanto a tipo, dosis y tiempo de administración. Estos objetivos han sido ampliamente analizados en nuestro estudio.

14. Bardaweel en 2014 (121), publicó un trabajo basado en un Cuestionario realizado a 428 varones estériles que consultan en clínicas de esterilidad de Amán en Jordania, unos pendientes de realizar FIV y otros no.

El cuestionario preguntaba si tomaban antioxidantes u otro tipo de medicinas alternativas (hierbas), dividiendo su población en dos grupos: uno que tomaba antioxidantes (43% de pacientes) y otro que no los tomaba (57%).

Los antioxidantes que más utilizaban eran las vitaminas C y E, seguidos de minerales como el selenio y zinc.

En sus observaciones no establecen ninguna evidencia sobre la efectividad de estos antioxidantes en esterilidad.

El diseño del estudio fue incapaz de demostrar una correlación positiva o negativa entre el uso de terapias alternativas y antioxidantes y un incremento en la tasa de embarazo.

15. Muy recientemente, en 2015, Gvozdjaková y cols (122), evalúan la asociación de cuatro antioxidantes administrados oralmente: Q10-ubiquinol, carnitina, vitamina E y vitamina C, en varones infértiles, sobre la calidad seminal.

Refieren que no hay estudios que analicen la suplementación de la asociación ubiquinol + carnitina.

Resultados a debatir con otros investigadores

Estudian cambios en los parámetros seminales y la concentración de estos antioxidantes en plasma sanguíneo y líquido seminal.

Trataron a 40 varones infértiles con oligoastenospermia, entre 3 y 6 meses. No hubo randomización con placebo.

Sus resultados indican mejoría en la concentración espermática, que aumentó un 48.9% a los 3 meses y un 80.9% a los 6 meses, y la patología espermática disminuyó un 25.8%.

Las concentraciones de estas sustancias se incrementaron significativamente tanto en plasma como en líquido seminal, sugiriendo que pueden ser utilizados como biomarcadores metabólicos en el diagnóstico y tratamiento del varón infértil.

Mencionan un 45% de embarazos espontáneos:

tras un mes de tratamiento 2 embarazos, tras 3 meses 4 embarazos, y después de 6 meses 12 embarazos, y que en 3 de ellos se realizó FIV.

CAPÍTULO 2.2. RESULTADOS GESTACIONALES en varones subfértiles, tratados con dos antioxidantes diferentes, en parejas que SI REALIZAN TECNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA: IAC en casos de astenospermia leve o FIV-ICSI en casos de astenospermia severa.

Esta parte de la investigación, es sin lugar a dudas, la más interesante y la que más novedosas conclusiones puede proporcionar, pues se centra en analizar con la literatura, todo lo existente sobre la toma de antioxidantes por varones subfértiles en parejas que SI precisan técnicas de reproducción asistida.

2.2.1. DISCUSIÓN CON AUTORES QUE ESTUDIAN ANTIOXIDANTES EN IAC EN CASOS DE ASTENOSPERMIA IDIOPATICA LEVE

Existen en la literatura muy pocas publicaciones y de escaso valor metodológico, que comuniquen estudios sobre resultados seminales y gestacionales tras tratamientos con antioxidantes en varones infértiles que precisen Inseminación Artificial Conyugal (IAC).

Debido a ello, las conclusiones de nuestro trabajo, pueden servir como primer referente a valorar por parte de investigadores, centros de fertilidad y unidades de reproducción asistida, respecto a la utilidad del tratamiento con antioxidantes en varones que precisan IAC.

Tan sólo disponemos de tres trabajos y no muy bien diseñados, con muy pocos casos, sobre antioxidantes en IAC.

1. La primera información la publicó Comhaire en 2005 (82), empleando como antioxidante la astaxantina.

La astaxantina es un carotenoide extraído de las algas *Hematococcus pluvialis*, con una potente acción antioxidante, que casualmente ha sido el más reciente

Resultados a debatir con otros investigadores

antioxidante comercializado por la industria farmacéutica en España, concretamente laboratorios Gynea, y registrado junto a otros antioxidantes con la denominación, Gestagyn Men.

Estos autores realizaron un estudio prospectivo, doble ciego y randomizado, en 30 varones con una esterilidad de más de 1 año. Su pareja no tenía ninguna causa de esterilidad.

La muestra que estudiaron fue muy pequeña: 19 varones placebo y solo 11 varones tratados con astaxantina.

Además, incluyeron varones que estaban siendo tratados con otras técnicas y otros fármacos, en ambos grupos de estudio: embolización de varicocele, antibióticos, y tamoxifeno. La duración del tratamiento fue de 90 días.

En un pequeño número de casos realizaron ciclos de IAC: 5 casos en el placebo y sólo 1 con astaxantina.

El criterio de realizar IAC fue un seminograma con al menos, 0.3M/mL de espermatozoides progresivos. Para nosotros, este REM es indicación de ICSI y no de IAC.

Trabajo metodológicamente muy pobre, muy heterogéneo, y solo 6 casos de IAC, con muchas limitaciones para ser valorado positivamente.

Aún así, indicar que sus resultados muestran una tendencia a mejorar la motilidad con el antioxidante, pero sin significación estadística (motilidad grado A: pretratamiento 28.5 ± 18.1 vs postratamiento $31.9 \pm 21.4\%$, $p > 0.05$).

También mejoró la concentración también sin significación estadística: pretratamiento 36.2 (25.1-56.1) vs postratamiento 48.6 (29.0-81.4 M/ml), $p > 0.05$.

Respecto a los embarazos, en el grupo placebo, de 19, hubo 2 embarazos espontáneos (tasa de 10.5%), y en el grupo astaxantina, de 11 casos, hubo 6 embarazos (tasa de 54.5%), lo cual les resultó significativo ($p = 0.028$ entre grupos).

Comentar anecdóticamente que, en el grupo placebo realizaron 5 IAC sin éxito y en el grupo astaxantina realizaron tan sólo 1 IAC y fue embarazo.

Los autores realizan observaciones favorables para los antioxidantes respecto a la tasa de embarazo conseguida con tan sólo 3 meses de tratamiento, pero hay que recordar que, son solo 6 embarazos.

Concluyen que el antioxidante, actúa de modo rápido, mejora la capacidad funcional del espermatozoide, y apenas modifica los parámetros básicos seminales. Esta mejora funcional puede ser debida a una reducción en los ROS y mejora en la motilidad lineal progresiva.

2. Attallah y cols (95) han comunicado muy recientemente sus resultados en un suplemento de *Fertility and Sterility* del 2013, tratando a varones astenospérmicos con el antioxidante N-acetilcisteína, y realizando posteriormente IAC.

Este trabajo corresponde a un póster presentado en el Congreso de la Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción (*ASRM*) del 2013, y realizado en Egipto.

Es un estudio controlado y randomizado, realizado en parejas que presentaban esterilidad primaria o secundaria y consultaban en una unidad de fertilidad.

El estudio lo realizaron en 60 varones con astenozoospermia idiopática (motilidad progresiva <32%): 30 tratados con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (600 mgr/día) durante 90 días, antes de realizar una inseminación artificial conyugal intrauterina. Grupo control, 30 varones sin tratamiento.

No describen el método de randomización. En ambos grupos el estudio de esterilidad de la mujer fue normal.

El objetivo de su estudio fue, valorar si con este antioxidante, mejoraba la calidad seminal y aumentaba la tasa de embarazo clínico tras realizar IAC con técnica de *swim-up*.

Sus resultados evidenciaron con carácter significativo que, la concentración espermática fue superior en el grupo NAC respecto al control (36.62 ± 9.2 M/ml

Resultados a debatir con otros investigadores

vs 31.9 ± 10.61 M/ml, $p=0.041$). También la motilidad progresiva fue significativamente superior en el grupo NAC (22.53 ± 11 vs 18.7 ± 7.81 %, $p=0.032$).

Respecto a la tasa de embarazo clínico, también fue superior pero no significativo, en el grupo NAC (6 de 30) (20.0%) respecto al grupo control (4 de 30) (13.3%), $p=0.25$.

3. Azizollahi y cols (97) han publicado también recientemente, en 2013, un trabajo efectuado en parejas que habían realizado dos ciclos previos de TRA sin éxito, entre 2010 y 2013, en clínicas francesas.

Los varones tenían fragmentación de DNA o descondensación de cromatina nuclear y muchos de ellos habían sido varicocelectomizados.

Estos varones tomaron suplementos antioxidantes, antes de realizar un nuevo ciclo de TRA.

El tratamiento antioxidante consistió en una combinación de vitaminas B, zinc y N-acetilcisteína, sustancias todas, efectoras del “ciclo de un carbono”, a dosis de 1 ó 2 tabletas por día, desde 59 días a 365 días. Duración media de tratamiento fue de 130 días

El estudio es muy poco valorable para IAC pues, tan solo realizaron 4 ciclos de IAC, (el resto hasta 66 ciclos de TRA, fueron ciclos de FIV-ICSI). Tampoco diseñaron un grupo control.

Los resultados no observaron ningún cambio significativo en los parámetros seminales antes y después del tratamiento (concentración $p=0,69$, motilidad $p=0,52$ y morfología $p=0,1$).

El grado de embarazo lo expresaron como embarazo clínico y nacido vivo, pero al ser tan pocos casos de IAC, no se puede extraer ninguna conclusión respecto a tasa de embarazo ni a parámetros seminales.

Los autores reconocen que el estudio no fue controlado y muy heterogéneo, y además sumaron en bloque tres TRA: IAC, FIV e ICSI, por lo que ninguna conclusión puede ser extraída referente únicamente a IAC.

Nuestro estudio es el de mayor número de casos analizados hasta la fecha de hoy en IAC, y el único comparativo entre dos tipos de antioxidantes.

*Hemos analizado a **55 parejas** con una única causa de esterilidad, astenospermia idiopática leve (REM mayor de 5M), realizando en ellas, un total de **97 ciclos de IAC**, 51 ciclos en varones control sin tratamiento y 46 en varones tomando antioxidantes, diferenciando varones con antioxidante único DHA (18 ciclos) de varones con antioxidantes combinados (28 ciclos).*

Además nuestro estudio garantiza que los grupos de análisis son homogéneos respecto a la variable seminal más importante, la motilidad progresiva pretratamiento, y por tanto, perfectamente comparables con los resultados postratamiento, como así se indica en el capítulo, resultados.

- Respecto a la valoración de la concentración espermática, concluimos que:

disminuyó significativamente en todos los grupos, independientemente del tipo de tratamiento, pero en un rango menor con antioxidantes, respecto al control, y sobre todo con antioxidante único.

Este efecto no depende ni de los días de tratamiento ni de la edad del varón.

Hay que considerar que los varones que participaron en nuestro estudio, no tenían una baja concentración espermática inicial, eran normales en este parámetro seminal, ya que solo fueron seleccionados por su baja movilidad (astenospermia).

Sus valores medios iniciales de concentración, en el momento de la inclusión en estudio, fueron altos y normales en todos los grupos, (control 71.7 M/ml, único 47.9 M/ml, combinados 72.6 M/ml).

Tras finalizar tratamiento, la concentración bajó en todos los grupos, pero siempre se mantuvo dentro del rango de la normalidad, y muy por encima de los valores mínimos normales descritos por la OMS (más de 15 M/ml): control 60.0 M/ml, único 42.7 M/ml, combinados 61.8 M/ml.

- Respecto a la valoración de la motilidad espermática, concluimos que:

Resultados a debatir con otros investigadores

aumentó significativamente tras el tratamiento antioxidante en todos los grupos, siendo este aumento independiente del tratamiento antioxidante utilizado y también independiente de la duración del tratamiento en días y de la edad del varón.

El efecto del factor tiempo es significativo ($p < 0,001$) y en consecuencia, la motilidad no es la misma entre el pretratamiento y el postratamiento, pero es independiente de la participación en el grupo control, único o combinado.

Concretamente, el grupo control incrementó la motilidad un 6.2%, el antioxidante único un 5.6%, y el combinado un 9.3%.

Aunque estas diferencias observadas, entre grupos, al finalizar los tratamientos, no sean significativas, es conveniente matizar que la mayor movilidad se alcanzó con antioxidantes combinados (32.1%), convirtiendo a estas muestras seminales en “normales” respecto a movilidad progresiva (criterio OMS de normalidad, mayor del 32%).

El trabajo de Attallah (95) sería el único a comparar y debatir, pues su diseño es aceptable y similar al nuestro, en cuanto a que todos son astenospermias idiopáticas, pero con menos casos de IAC (60 ciclos Attallah, 96 ciclos nosotros) y menor duración de tratamiento (media de 90 días Attallah, nosotros media de 120 a 135 días).

Además, solo comparan un antioxidante, la N-acetilcisteína, con placebo. No existe estudio comparativo de antioxidantes entre sí.

Los resultados son diferentes para la concentración, ya que a ellos les aumenta significativamente y a nosotros nos disminuye, pero si coincidimos en lo mas interesante, que es la motilidad, ya que en ambos estudios se observó un aumento significativo.

- Respecto a resultados gestacionales de antioxidantes vs control:

Hemos querido expresar los resultados gestacionales con diferentes tasas de embarazo, clasificándolas en: tasa de embarazo bioquímico, clínico, viable, a término y de recién nacido vivo sano, en todos los grupos analizados, control y tratamiento con antioxidantes, en parejas a las que se ha realizado IAC.

Esta forma de expresar los resultados en cuanto a embarazos, es mucho más completa y sobre todo más real, ya que se pone de manifiesto, todos los embarazos que se pierden precozmente (abortos) o no llegan a término, o no nace un niño vivo y sano.

*Hemos observado que, la tasa de embarazo/ciclo bioquímico (B-hCG+), para el grupo antioxidantes en general, fue muy elevada, un **34,8%**, frente al **17,6%** en el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.*

En el resto de tasas de embarazo/ciclo, (clínico, viable, a término y recién nacido vivo sano), siempre fueron superiores en el grupo antioxidantes en general respecto al control, pero sin observar diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Concretamente, la tasa de embarazo/ciclo de IAC con recién nacido vivo sano (RNVS), que debemos considerar como la de más entidad y más válida, fue superior en el grupo antioxidantes (**19,6%**) respecto al grupo control (**13,7%**), pero no significativo.

- Respecto a *resultados gestacionales comparando antioxidantes entre sí (único vs combinados)*:

*Hemos observado que la tasa de embarazo/ciclo bioquímico (B-hCG+) en el grupo de **antioxidantes combinados**, fue significativamente superior, **42,9%**, frente al **22,2%** en pacientes con antioxidante único, y al **17,6%** para el grupo control.*

En el resto de tasas de embarazo evaluadas y de RNVS, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de antioxidante utilizado, aunque hay que mencionar que en el grupo de antioxidantes combinados, las tasas de embarazo, clínico, viable, a término y RNVS, fueron siempre las más elevadas, comparando con control y con antioxidante único.

Concretamente, la tasa de embarazo/ciclo de IAC con recién nacido vivo sano (RNVS), fue superior en el grupo antioxidantes combinados (**25,0%**) respecto al grupo antioxidante único (**11,1%**) y al control (**13,7%**), aunque no estadísticamente significativo.

Resultados a debatir con otros investigadores

El trabajo de Comhaire (82) no proporciona datos de embarazos tras realizar IAC. Sus resultados son referidos a *tasa de embarazos espontáneos*.

Observa un aumento significativo de embarazos tras tomar el varón astaxantina (54.5%) comparando con controles no tratados (10.5%).

Attallah y cols (95) también coinciden con nuestro trabajo respecto a los resultados gestacionales tras realizar IAC.

Refieren una tasa de embarazo clínico superior con antioxidantes (N-acetilcisteína) respecto a no tratados, pero no significativo (antioxidante **20.0%** vs controles **13.3%**, NS).

*En nuestro estudio, los resultados respecto a tasa de embarazo clínico son casi idénticos a ellos, realizando más ciclos de IAC: **antioxidantes 23.9%** vs **controles 13.7%**, NS.*

2.2.2. DISCUSIÓN CON AUTORES QUE ESTUDIAN ANTIOXIDANTES EN FIV-ICSI EN CASOS DE ASTENOSPERMIA IDIOPATICA SEVERA

Tan solo 6 publicaciones hemos encontrado en la literatura y algunas de ellas de escaso valor metodológico, que comuniquen estudios sobre resultados seminales y gestacionales tras tratamientos con antioxidantes en varones infértiles que precisen FIV-ICSI.

Debido a ello, las conclusiones de nuestro trabajo, pueden servir como primer referente a valorar por parte de investigadores, centros de fertilidad y unidades de reproducción asistida, respecto a la utilidad del tratamiento con antioxidantes en varones que precisan FIV-ICSI.

1. Paes de Almeida y cols (123) publican en 2012 en *Fertility and Sterility*, un estudio interesante que relaciona la influencia del estilo de vida (tipo de alimentación y hábitos sociales), del varón que se va a someter a un proceso de ICSI, sobre los parámetros seminales y tasa de embarazo.

Se trata de un estudio observacional en 250 varones que realizaron un ciclo de ICSI en un centro privado de reproducción asistida en Sao Paulo, Brasil.

A los varones les realizaron entrevistas, para conocer sus hábitos alimenticios, centrándose en la toma de: cereales, vegetales, legumbres, frutas, carne roja y de cerdo, pollo, pescado, dulces, alcohol, bebidas con cafeína y café.

Se registro el grado de consumo. También se analizó, la pérdida de peso, la intensidad del ejercicio y el consumo de tabaco (número de cigarros/día).

Sus resultados indican que, respecto a los parámetros seminales, la concentración espermática fue influida negativamente por el IMC (índice de masa corporal) y por el consumo de alcohol, y positivamente por el consumo de cereales.

La motilidad espermática, fue afectada negativamente por el IMC, el alcohol y el tabaco, y positivamente por los cereales y las frutas.

Respecto a los resultados tras ICSI, la fertilización se afectó negativamente por el consumo de alcohol y café por el varón.

El consumo de carne roja, afectó negativamente la implantación, junto a las dietas de pérdida de peso, y positivamente con los vegetales que contienen muchos micronutrientes y antioxidantes.

La tasa de aborto no se vio influida por ningún hábito alimenticio ni social.

El tabaco puede condicionar una disminución en los niveles de antioxidantes en el plasma seminal facilitando el estrés oxidativo.

En este trabajo se demuestra que la alimentación con una dieta rica en cereales, vegetales y frutas, que contienen, minerales, aminoácidos y vitaminas antioxidantes, mejora significativamente la motilidad espermática, y la implantación tras ICSI.

2. La publicación primera en ciclos de FIV, la realizó Kessopoulou (63) hace ya 21 años (1995) en *Fertility and Sterility*.

Resultados a debatir con otros investigadores

Estos autores utilizaron el antioxidante vitamina E, en varones con infertilidad debida a elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) en semen, y que precisaban FIV. No existían otras causas de esterilidad en la pareja.

Valoraron la función in vitro de los espermatozoides en base a: seminograma convencional, cuantificación de la generación de ROS y capacidad de unión de los espermatozoides a la zona pelúcida de ovocitos no fertilizados (test de zona). Este fue un test que se realizaba frecuentemente en aquella época.

El estudio se realizó en Sheffield (UK) y reclutaron a 30 parejas en un ensayo doble ciego, randomizado con placebo. El estudio duró 2 años.

Los 15 varones del grupo de estudio recibieron vitamina E (600 mg/día) y los 15 varones del placebo, idénticas tabletas, durante 3 meses.

Estimaron como éxito primario los cambios en los parámetros seminales in vitro, y como secundarios, la valoración de efectos adversos y la tasa de embarazo clínico.

Concluyeron que el aumento plasmático de vitamina E en varones con elevadas concentraciones de ROS en semen, mejoraba el test de unión a la zona pelúcida de modo significativo (grupo placebo test de zona 0.3 y grupo vitamina E test de zona 0.5).

La administración oral de vitamina E mejora significativamente la función in vitro del espermatozoide humano valorado por el test de unión a zona pelúcida.

Observaron un aumento no significativo de la tasa de embarazo clínico con vitamina E.

3. La segunda publicación en este sentido, la encontramos diez años después, en 2005, Greco y cols (66) publican en *Human Reproduction*, un estudio que fue uno de los pocos seleccionados por los revisores *Cochrane*, para ser evaluado, por su buen diseño metodológico y escasa heterogeneidad.

Estudio muy completo en cuanto a expresión de resultados pues valoraron: parámetros seminales, embrionarios y gestacionales.

Discusión

Ellos realizaron en la misma pareja, dos ciclos de ICSI, separados uno de otro un máximo de 5 meses, y comparan sus resultados.

El primer ciclo ICSI lo realizaron en 38 parejas donde todos los varones tenían fragmentación de DNA (valorado por test del TUNEL mayor del 15%), y además, 32 de ellos tenían alteraciones en el seminograma del tipo oligoastenoteratozoospermia.

Estos varones, en su primer ciclo de ICSI, no recibieron antioxidantes ni tratamiento médico alguno. Hubo sólo 2 embarazos tras ICSI en 38 ciclos (tasa de embarazo bioquímico bajísima, un 5,2%), y que además abortaron, tras observar actividad cardíaca positiva (tasa de embarazo clínico 0%).

Debido a ello, las 38 parejas volvieron a reiniciar un segundo ciclo de ICSI, pero tratando al varón con antioxidantes a base de vitamina C mas vitamina E, constituyendo el segundo grupo de estudio.

El tratamiento antioxidante consistió en administrar a los 38 varones, 1g de vitamina E más 1g de vitamina C al día, durante 2 meses.

A los 2 meses se repitió en ellos el test del TUNEL, y solo se realizó ICSI en 29 varones que mejoraron sensiblemente la fragmentación de DNA (los 9 varones que no mejoraron, se sometieron a biopsia testicular para posterior ICSI, y no entraron en estudio).

Esta exclusión, es un sesgo del estudio, pues seleccionan para realizar ICSI, a varones que si mejoraron considerablemente su fragmentación de DNA tras tratamiento antioxidante.

Por ello, los resultados comparativos finales del estudio, se extrajeron de 29 ciclos ICSI sin antioxidantes (no tratamiento) y 29 ciclos ICSI con antioxidantes, realizados en la misma mujer.

Sus resultados no observaron ninguna diferencia significativa en los parámetros básicos seminales concentración y motilidad: concentración espermática antes y después: 17.9 ± 16.3 M/ml vs 18.3 ± 17.9 M/ml, $p > 0.05$, NS; motilidad espermática antes y después: 40.6 ± 24.8 vs 39.9 ± 19.0 %, $p > 0.05$, NS.

Resultados a debatir con otros investigadores

No encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos MII microinyectados (288 vs 276, NS), en el número de embriones obtenidos (199 vs 195, NS), en el grado de fertilización (69.1% vs 70.7%, NS), ni en el número o porcentaje de embriones de buena morfología a transferir en día 3 (86 vs 92, NS; 45.7% vs 50.8%, NS).

Sin embargo, respecto a los resultados gestacionales, el grado de implantación fue significativamente superior con antioxidantes (2.2% sin tratamiento vs 19.6% con antioxidantes, $p < 0.01$).

El grado de embarazo bioquímico (B-hCG+) fue significativamente superior con antioxidantes respecto a no tratamiento (48.3% vs 6.9%, $p < 0.05$), siendo el grado de gemelaridad del 28.6% con antioxidantes.

Este estudio, aunque no controlado, fue el primero en demostrar que, en varones con elevada fragmentación de DNA que, tras tratarse 2 meses con antioxidantes mejoran su fragmentación, y realizando posteriormente ICSI, obtienen unos excelentes resultados gestacionales, aunque no mejoren los parámetros seminales básicos como la concentración y la motilidad.

Sugieren que el no observar diferencias en los parámetros embrionarios tras mejorar el daño del DNA, es debido al denominado “*late paternal effect*” (trabajos de Tesarik citados en Greco 2005).

Una elevada fragmentación de DNA causa un efecto paterno tardío, reduciendo el grado de implantación, pero sin asociarse con mala calidad embrionaria.

4. *Dos años después de la anterior publicación, en 2007, Tremellen y cols (62) publican en una revista australiana, uno de los trabajos más importantes, o quizás el mejor, por su diseño metodológico y número de casos, expresión de resultados gestacionales con tasas de nacido vivo-sano y tasa de abortos, sobre la utilización de un antioxidante en ciclos de FIV-ICSI.*

Es un estudio prospectivo, controlado, randomizado por bloques (2:1), unicéntrico, realizado en una única unidad de reproducción asistida en Adelaida (Australia).

Discusión

Los varones randomizados pertenecían a parejas en que las mujeres tenían reserva ovárica normal y todas eran menores de 39 años.

Todos los varones seleccionados tenían un probable estrés oxidativo valorado por seminograma con alterada morfología, movilidad y baja integridad de membrana.

Además, valoraron la fragmentación del DNA por la técnica del Túnel, y todos la tenían mayor del 25%.

La edad media de los varones que tomaron antioxidantes fue de 37.1 ± 5.1 años y la del grupo control, 35.5 ± 4.3 años. El estudio duró un año y medio.

Participaron 60 varones con sus parejas realizando 1 ciclo de FIV-ICSI: 60 parejas y 60 ciclos de FIV-ICSI.

El grupo de tratamiento antioxidante, estuvo formado por 40 varones tratados con antioxidantes combinados diseñados específicamente para el estudio, con la finalidad de mejorar el estrés oxidativo, manufacturado por la compañía farmacéutica Bayer, denominándolo comercialmente como, MENEVIT®.

Su composición por cápsula era: licopeno 6 mg, vitamina E 400UI, vitamina C 100mg, zinc 25mg, selenio 26ug, folatos 0.5mg, ajo 1000mg, y aceite de palma como excipiente.

Los autores sugieren que:

- las vitaminas E y C, el selenio, el ajo y el licopeno neutralizan los radicales libres producidos por los espermatozoides inmaduros o por los leucocitos.
- el licopeno y el ajo tienen una potente acción antiinflamatoria, reduciendo la producción de radicales libres por los leucocitos seminales.
- el zinc, folato y selenio, aumentan las protaminas que protegen al DNA de la fragmentación.

Resultados a debatir con otros investigadores

La dosis fue de una cápsula al día después de la comida, comenzando tres meses antes del ciclo FIV.

El grupo placebo fue de 20 varones, que tomaban idéntica cápsula en apariencia y también con aceite de palma.

El ciclo FIV-ICSI fue realizado con el clásico protocolo largo de agonistas, utilizado mayoritariamente en aquellos años, con FSH a dosis de 150-300 UI/día y posterior ICSI.

Consideraron éxito primario la valoración de los parámetros embrionarios, concretamente el grado de calidad embrionaria según los tradicionales criterios morfológicos: grado 1 (excelente), grado 2 (bueno) y grado 3 y 4 (regulares).

La transferencia la realizaron mayoritariamente en D+2 y D+3. Solo realizaron transferencia en cultivo largo (D+5, blastocistos), en el 30% de los ciclos de Menevit® y en el 25% de los ciclos placebo. No todas las parejas llegaron a transferencia: de las 60 parejas iniciales, se realizó transferencia en 52 (36 de Menevit® y 16 de placebo).

El apoyo de la fase lútea se hizo con gel de progesterona vaginal (Crinone®) más 500UI de hCG en el D+6.

Consideraron como éxitos secundarios, el grado de embarazo viable, el grado de fertilización y la valoración de los efectos adversos en el varón.

La tasa de embarazo que consideraron fue: embarazo bioquímico, tras B-hCG+, y embarazo viable, que ellos definieron ante una ecografía a las 8 semanas con latido cardíaco positivo y que siguieron hasta la semana 13, con buena evolución.

No valoraron tasa de nacido vivo sano.

Sus resultados ovocitarios y embrionarios fueron: obtuvieron más ovocitos MII de modo significativo en el grupo Menevit®, (9.3±3.8), que en el placebo, (7.9±3.2, p= 0.19).

El grado de fertilización también fue superior en el grupo Menevit®, pero no significativo (68.8% vs 63.0%, NS).

Discusión

No observaron diferencias significativas en el grado de calidad embrionaria morfológica entre grupos en el día de la transferencia: (Menevit® 11.6% embriones grado 1 vs Placebo 13.7%, NS; Menevit® 44.2% embriones grado 2 vs Placebo 37.6%, NS; Menevit® 44.2% embriones grado 3 y 4 vs Placebo 48.7%, NS).

La media de embriones transferidos fue ligeramente superior en el placebo y significativo (Menevit 1.39±0.6 vs placebo 1.56±0.5, p= 0.33).

El grado de implantación fue casi el doble en el grupo Menevit® respecto al placebo (46.2 vs 24%, p= 0.06).

El grado de embarazo bioquímico por transferencia (B-hCG+), también fue muy superior en Menevit® (63.9% vs 37.5%, p= 0.07). La tasa de embarazo viable (semana 13), fue significativamente superior en el grupo Menevit® respecto a placebo (38.5% vs 16%, p= 0.04).

A pesar de transferir menos embriones en el grupo Menevit® y de similar calidad, la tasa de implantación y la tasa de embarazo fue significativamente superior. Probablemente, sugieren ellos, porque estaban transfiriendo un número de embriones cromosómicamente sanos en número muy superior al grupo placebo.

Esto podría atribuirse a la acción de los antioxidantes protegiendo la fragmentación del DNA en los varones tratados.

La prestigiosa revisora Cochrane, debido al enorme interés de la publicación, y a la escasez de trabajos posteriores en esta línea investigadora, solicitó al profesor Tremellen, en Diciembre del 2014, que proporcionara información sobre los nacidos vivos.

El profesor contestó que, solo hubo un aborto tardío en la semana 19 en el grupo Menevit®. Todos los demás embarazos finalizaron con el nacimiento de niños vivos y sanos. Hubo tres gemelares en el grupo Menevit® y ninguno en el placebo.

Resultados a debatir con otros investigadores

Respecto a efectos adversos del Menevit®, solo se registraron tres casos de alteraciones gastrointestinales (reflujo y diarrea) y ningún participante abandonó el estudio.

Este estudio fue el primero en sugerir que los antioxidantes combinados pueden aumentar la tasa de embarazo en varones afectos de fragmentación de DNA, tras un tratamiento de FIV-ICSI.

5. Comhaire (124), profesor actualmente emérito de la Universidad de Gante, junto a Decler, Director de la Clínica Belga de Fertilidad, publican en 2012 en *Andrology*, un estudio investigando el papel de los suplementos alimenticios nutricionales como tratamiento clínico de la infertilidad masculina y femenina.

Ellos formulan un preparado nutracéutico que denominan Qualisperm®, basado en estas sustancias antioxidantes y dosis, por píldora:

- MACA (*lepidium meyenii*) 250mg
- Picnogenol 100mg
- L-acetilcarnitina 100mg
- Carnitina : 100mg
- Co-enzima Q10: 25mg
- Astaxantina 8mg
- Zinc 7.5mg
- Vitamina B6 3mg
- Acido Fólico 0.2mg
- Vitamina B12 15ug

La MACA suprime el estrés oxidativo, bloqueando la proteína P70, mejorando la fertilidad en animales de experimentación (125), y también la calidad espermática en el hombre (126).

El Picnogenol, extraído del pino mediterráneo, ha sido beneficioso en mujeres infértiles reduciendo daño ovocitario.

La astaxantina, un carotenoide extraído de las algas *hematococcus pluvialis*, mejora la motilidad espermática (82).

Discusión

La vitamina B6 y el zinc, son cofactores para las enzimas elongasas y desaturasas, que incrementan la producción de ácidos grasos de cadena larga EPA y DHA.

Los varones tratados tomaron 2 cápsulas por día en solución aceitosa de Qualisperm®, y las mujeres 2g diarios de aceite de pescado rico en EPA y DHA, ambos durante 3 meses.

Estas parejas realizaron 3 meses después de finalizar este tratamiento un ciclo de FIV-ICSI. No tienen grupo control.

Sus resultados indicaron respecto a los parámetros seminales, un significativo incremento tras el tratamiento de la concentración espermática en un 60%, $p=0.02$; la motilidad progresiva tipo A y la tipo A+B multiplicó por tres los valores iniciales, $p=0.006$, y la morfología mejoró un 40%, $p=0.016$.

En cuanto a los resultados gestacionales, compararon los obtenidos en su centro en el año 2006 (los llamaron controles históricos), con los obtenidos tras tratamiento con estas sustancias en el 2010.

Describen un aumento en la tasa de embarazo bioquímico tras transferencia de un 26% a un 35% (no aportan número de ciclos, significación estadística, etc).

6. Azizollahi y cols en 2013 (97) realizaron un estudio en parejas que habían efectuado previamente dos ciclos de TRA sin éxito, entre 2010 y 2013 en clínicas francesas.

La indicación fue, varones con fragmentación de DNA o descondensación de cromatina nuclear.

Estos varones tomaron suplementos antioxidantes, antes de realizar un nuevo ciclo de TRA.

El tratamiento consistió en una combinación de vitaminas B, zinc y N-acetilcisteína, sustancias todas, efectoras del “ciclo de un carbono”.

Se reclutaron 84 pacientes que tomaron 1 ó 2 tabletas por día, de 2 a 12 meses. No hubo grupo control. La duración media fue de 130 días (de 59 a 365 días), realizando en 80 parejas FIV o ICSI.

Resultados a debatir con otros investigadores

Los resultados no observaron ningún cambio en los parámetros seminales antes y después del tratamiento (concentración $p=0,69$, motilidad $p=0,52$ y morfología $p=0,1$).

El grado de embarazo lo expresaron como embarazo clínico y nacido vivo. De los 80 parejas, hubo 40 embarazos clínicos (50%), 7 abortos (17,5%) y 33 nacidos vivos (41,2%). De estas 80 parejas, 18 embarazos fueron espontáneos sin TRA.

Fueron a TRA el resto, 62 parejas: 18 a FIV y 44 a ICSI. De ellas, hubo 22 embarazos clínicos (35,4%), 7 abortos (31,8%) y 15 nacidos vivos (24,2%).

La duración del tratamiento no influyó en el grado de embarazo.

Los autores reconocen que el estudio no fue controlado y muy heterogéneo, para validar con suficiencia sus resultados.

Nuestros resultados se han obtenido tras analizar un número importante de parejas con astenospermia idiopática y de ciclos de ICSI, durante un periodo de estudio de 4 años. No existe ningún trabajo en la bibliografía hasta hoy, randomizado con no tratamiento y comparativo entre antioxidantes, que estudie este elevado número de casos y exprese sus resultados con tasa de nacido vivo sano tras FIV-ICSI.

*Hemos realizado un total de **162 ciclos ICSI en 124 parejas con astenospermia idiopática severa, siendo con antioxidantes 84 ciclos y controles o no tratamiento 78 ciclos.***

- Respecto a *parámetros seminales*:

Los autores anteriores expresan resultados totalmente contradictorios en varones que precisan ICSI.

De 5 trabajos que comunican resultados seminales, dos de ellos, coinciden y no observan mejoría alguna en ningún parámetro seminal tras tratamiento antioxidante (Greco utilizando combinados vitamina E mas vitamina C, y Azizollahi empleando combinados).

En otros dos estudios, si se comunica una mejoría significativa en todos los parámetros: concentración, motilidad y morfología (Comhaire), utilizando combinados, y en el test de unión a la zona pelúcida (Kessopoulou), utilizando únicamente vitamina E.

En el trabajo restante (Pas de Almeida), observa que la alimentación con cereales, vegetales y frutas (antioxidantes), no mejora la concentración pero sí y de modo significativo, la motilidad espermática.

Si recordamos los resultados en varones que no realizaron TRA, también eran contradictorios y muy diferentes de unos a otros investigadores.

En nuestro estudio, la “concentración” disminuyó significativamente en todos los grupos, independientemente del tipo de tratamiento, pero menos con antioxidantes, y sobre todo con antioxidante único.

Este efecto fue independiente de los días de tratamiento y de la edad.

Estos resultados son casi superponibles a los obtenidos en varones con astenospermia leve que realizaron IAC.

Por el contrario, la “motilidad progresiva” aumento significativamente en todos los grupos, independientemente del tipo de tratamiento.

La motilidad aumentó significativamente tras el tratamiento en los dos grupos de antioxidantes, siendo máxima con combinados, siendo este aumento independiente del tratamiento utilizado y también independiente de la duración del tratamiento en días y de la edad.

También resultados bastante superponibles a los observados en varones con astenospermia leve que realizan IAC.

Coincidimos totalmente con las conclusiones del estudio de Pas de Almeida, que analiza el estilo de vida y los hábitos alimenticios en varones que se van a someter a ICSI.

Ellos, solo modificando hábitos alimenticios incrementado la toma de alimentos por el varón, con elevada concentración de antioxidantes, mejoran la motilidad

Resultados a debatir con otros investigadores

espermática de manera similar a la observada en nuestro estudio, tomando suplementos nutracéuticos antioxidantes, tanto únicos como combinados.

- Respecto a *parámetros embrionarios*:

Datos medios por ciclo, más destacables, de los 162 ciclos de ICSI realizados en el estudio, sumando ciclos de antioxidantes y controles:

se obtuvieron tras punción una media de 7.3 ovocitos metafase II, dando lugar tras ICSI a una media de 4.9 embriones.

La tasa media de fertilización fue de 68.4%, y transferimos una media del 71.9% de todos los embriones.

La calidad embrionaria según criterios ASEBIR el día de la transferencia fue: A 23.0%, B 40.9%, C 28.5% y D tan sólo un 6.8%.

El único estudio que ha evaluado los parámetros embrionarios de forma similar a nosotros, fue el liderado por Tremellen, comparando 40 ciclos ICSI de antioxidantes combinados administrados 90 días, con 20 ciclos ICSI placebo.

Ellos sí encontraron diferencias significativas a favor de los antioxidantes, respecto a una mayor tasa de fertilización, pero no significativa (68.8% antioxidantes vs 63.0% placebo, NS).

Sin embargo, la media de embriones transferidos fue significativamente superior en el placebo (1.39 ± 0.6 antioxidantes vs 1.56 ± 0.5 placebo).

La calidad embrionaria el día de la transferencia, fue similar en ambos grupos sin observar diferencias significativas (antioxidantes 11.6% embriones grado 1 vs placebo 13.7%, NS; antioxidantes 44.2% embriones grado 2 vs placebo 37.6%, NS; antioxidantes 44.2% embriones grado 3 y 4 vs placebo 48.7%, NS).

Greco y cols, no encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos MII microinyectados (288 vs 276, NS), en el número de embriones obtenidos (199 vs 195, NS), en el grado de fertilización (69.1% vs 70.7%, NS), ni en el número o porcentaje de embriones de buena morfología a transferir en día 3 (86 vs 92, NS; 45.7% vs 50.8%, NS).

Pas de Almeida comprueba que la tasa de fertilización tras ICSI también es superior en varones cuya alimentación se enriquece con cereales y fruta, y disminuye si tienen hábitos tóxicos como ingerir alcohol y tomar café.

En nuestro estudio, realizado con muchos mas ciclos de ICSI (162), tras comparar los parámetros de laboratorio ovocitarios y embrionarios según grupo control de no tratamiento y grupos de antioxidantes único y combinados, no hubo diferencias significativas entre grupos de estudio, en ninguno de los parámetros de laboratorio evaluados:

número de ovocitos aspirados, número de ovocitos MII, número de embriones obtenidos, número de embriones transferidos, % calidad embrionaria, y tasa de fertilización.

- Respecto a la *tasa de implantación*:

Pas de Almeida observó que los varones que comían vegetales con muchos antioxidantes, tenían tras ICSI, una significativamente superior tasa de implantación, y aquellos que comían mucha carne roja, les disminuía la tasa de implantación.

En el estudio de Tremellen, el grado de implantación fue casi el doble en el grupo antioxidante respecto al placebo, de modo significativo (46.2% vs 24%, $p= 0.06$).

Greco estudiando 76 ciclos ICSI, entre placebo y antioxidantes combinados, también encontró un aumento en el grado de implantación, que fue significativamente superior con antioxidantes (2.2% sin tratamiento vs 19.6% con antioxidantes).

Nosotros no hemos observado estas diferencias, ya que nuestra tasa de implantación fue similar entre los tres grupos de estudio (control 57.84%, antioxidante único 54.17% y antioxidantes combinados 58.3%) y no significativo.

- Respecto a los *resultados gestacionales*:

Los revisores de *Cochrane* 2014 (94) plantearon como objetivo, valorar la efectividad de la suplementación oral con antioxidantes en el varón subfértil, en parejas con deseo reproductivo, incluyendo a parejas que realizaron TRA. Incluyeron estudios controlados y randomizados, que comparan cualquier tipo o dosis de antioxidante (único o combinado), tomado por el varón de una pareja con esterilidad, randomizado con placebo, no tratamiento u otro antioxidante. Tomaron como objetivo primario de éxito, la tasa de niño nacido vivo por pareja randomizada y como éxitos secundarios: tasa de embarazo clínico por pareja, acontecimientos adversos, fragmentación de DNA, motilidad y concentración espermática.

Seleccionaron 48 estudios, que incluían 4179 hombres subfértiles, de los cuales 2466 fueron tratados con antioxidantes y 1713 pertenecían a los grupos control o no tratamiento.

Estas parejas habían consultado en clínicas de fertilidad y buscaban embarazo como mínimo durante 1 año. La edad del varón osciló entre 20 y 52 años y la mayoría se diagnosticaron de oligospermia y/o astenospermia, pero no todos fueron de causa idiopática. El estudio de fertilidad de la mujer era normal.

Pero lamentablemente, de los 48 trabajos seleccionados, solo había 3 dedicados a FIV-ICSI (63,66,62).

En sólo 3 estudios: Kessopulou (63), Greco (66) y Tremellen (62), se realizaron ciclos de FIV-ICSI, y en conjunto fueron tratados con diferentes antioxidantes solo 93 varones.

Ningún estudio definió la tasa de nacido vivo como el éxito primario y muy pocos incluyeron la tasa de embarazo clínico como éxito primario.

Los revisores, al hacer un estudio de meta-análisis sumando los casos de los tres trabajos, observan que la toma de antioxidantes, de modo significativo, no se asocia con un aumento de la tasa de embarazo clínico comparado con placebo (OR 2.64, 95% CI 0.94 a 7.41, $p=0.07$).

Pero anteriormente, valorando uno por uno cada estudio, por separado, (muestras más pequeñas), los resultados que expresan sus autores, son diferentes :

- en los tres hay aumento de tasa de embarazo bioquímico significativa.
- Tremellen, observó un aumento significativo de embarazo clínico (40 casos con antioxidantes combinados).
- Kessopoulou, observó también un aumento, pero no significativo, de embarazo clínico (solo 15 casos con antioxidante único vitamina E durante 3 meses).
- El tercer trabajo de Greco, no valoró embarazo clínico.
- Comhaire, administró durante 3 meses antioxidantes combinados previo a ICSI y comparó la tasa de embarazo bioquímico con varones controles que él llamó “históricos”, de años atrás. Observó una tasa mayor con antioxidantes, pero se trata de un estudio metodológicamente muy defectuoso pues también trató a las mujeres con antioxidantes DHA + EPA.
- El único estudio que ofrece resultados tras antioxidantes combinados, con tasa de nacido vivo, es el de Azizollahi, que realizó 62 ciclos de FIV-ICSI en varones con un ciclo previo de FIV fallido y con fragmentación de DNA. No tiene grupo control para comparar.

En su estudio, los resultados gestacionales tomando el varón antioxidantes, fueron muy buenos, con una tasa de embarazo clínico del 35.4% y de nacido vivo del 24.2%.

En nuestro estudio, los resultados gestacionales se describen como, tasas de embarazo/transferencia bioquímico, clínico, viable, a término, y de recién

Resultados a debatir con otros investigadores

nacido vivo sano, en los grupos de estudio, control y tratamiento con antioxidantes, en parejas a las que se les realizó ICSI.

*Se observa que, **la tasa de embarazo bioquímico** para el grupo **antioxidantes** fue del **39,8%**, frente al **23,1%** en el **grupo control**, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.023$).*

Al comparar el resto de tasas de embarazo (clínico, viable, a término y RNVS), siempre fueron superiores en parejas cuyo varón tomaba antioxidantes, pero sin observar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

*Por ejemplo, la tasa más novedosa, la de **RNVS**, fue de **20.5% en controles** y de **26.5% en antioxidantes** (NS).*

No existe ningún estudio en la literatura, que comparando antioxidantes entre sí, exprese sus resultados informando de tasas de embarazo clínico o de recién nacido vivo sano.

En nuestro estudio, y por primera vez, se describen las tasas de embarazo según tipo de antioxidante y comparando con controles.

*Al separar los antioxidantes entre, único y combinados, y compararlos con el grupo control, creemos conveniente destacar que, **la tasa de embarazo bioquímico**, tanto en el grupo **antioxidante único (37,5%)**, como **combinados (41,9%)**, fue muy superior al grupo **control (23,1%)**, y esta diferencia es significativa.*

*En el resto de tasas de embarazo no se observan diferencias significativas aunque con cualquier antioxidante, siempre fueron superiores a los controles. Por ejemplo, la **tasa de RNVS** fue de **20.5% en controles**, de **23.3% con combinados** y de **30.0 con antioxidante único**.*

- Respecto a la *tasa de aborto*:

Cuando se diseñó el estudio en 2011, estudiar la tasa de aborto tras antioxidantes, se consideró un objetivo muy secundario, no importante, pues no esperábamos encontrar cambios sustanciales.

Sin embargo, los resultados encontrados, convierten a este apartado en una de las “sorpresas investigadoras” del estudio, más aún al comprobar que la literatura, apenas da información sobre la tasa de aborto en embarazos conseguidos tras tomar el varón antioxidantes, y mas en ciclos de TRA.

La revisión *Cochrane*, con 48 publicaciones analizadas, refiere que solo 3 trabajos mencionan la tasa de aborto: estos autores solo encuentran 8 abortos en 247 parejas estudiadas.

Ante este reducido número de casos, concluyen que la tasa de aborto tras antioxidante es muy baja, no existiendo ninguna asociación significativa entre antioxidantes y aborto, comparando con no tratamiento (OR 1.74 95% CI 0.40 a 7.60, $p=0.46$). Calidad de la evidencia “muy baja”.

Además, en ciclos de reproducción asistida, no existen estudios suficientes que analicen la tasa de aborto tras tomar antioxidantes vs control, y no se puede concluir nada.

Pas de Almeida (123) refiere que la tasa de aborto no se ve influida por la toma de ningún alimento en especial.

Tremellen (62), aunque no publicó datos sobre abortos, cuando fue preguntado por sus resultados de niños vivos, informó de que de 40 parejas, tratando al varón con antioxidantes combinados, solo hubo 1 aborto.

Sin embargo, Azizollahi en 2013 (97), sin grupo control y estudiando a 62 varones con fragmentación del DNA, tratados con antioxidantes combinados y realizando FIV-ICSI en ellos, observó una tasa de aborto muy elevada, del 31.8%.

Nuestros resultados concluyen también con una tasa de aborto muy elevada y preocupante, sobre todo al comparar con controles no tratamiento.

La tasa de aborto la hemos obtenido de 259 ciclos de tratamientos de reproducción asistida, considerando tanto los ciclos realizados de IAC como los de ICSI, sumando tanto los controles como los antioxidantes.

Resultados a debatir con otros investigadores

Se consiguieron 76 embarazos bioquímicos en total, y de ellos hubo 23 abortos, lo que supone una **tasa de aborto** global por ciclo de reproducción asistida, del **30.2%**.

Si diferenciamos la tasa de aborto según **grupos de estudio**:

- el grupo **control** y el **antioxidante único**, tienen una tasa similar (**22,2** vs **21,1%**), pero sube considerablemente en el grupo de **antioxidantes combinados** (**43,3%**), aunque estas importantes diferencias no han sido significativas ($p=0,134$), probablemente por el bajo número de casos analizados (23 abortos).

Si diferenciamos la tasa de aborto según **TRA**:

- **ICSI**: Tasa de aborto en 162 ciclos sumando controles mas antioxidantes:

se consiguieron 51 embarazos bioquímicos en total, y de ellos hubo 15 abortos, lo que supone una **tasa de aborto por ciclo del 29,4%**.

Si diferenciamos en controles y tipo de antioxidante, observamos que la **tasa de aborto en controles y antioxidante único** fue similar (**22,2%** vs **20,0%**), aumentando considerablemente en **antioxidantes combinados** (**44,4%**) pero sin significación estadística.

- **IAC**: Tasa de aborto en 97 ciclos , sumando controles y antioxidantes:

se consiguieron 25 embarazos bioquímicos en total, y de ellos hubo 8 abortos, lo que supone una **tasa de aborto por ciclo del 32,0%**.

La tasa en **controles y antioxidante único** fue similar (**22,2%** vs **25,0%**) aumentando considerablemente en **antioxidantes combinados** (**41,6%**) pero sin significación estadística.

Es llamativo observar en nuestro estudio, como las tasas de aborto, tanto en 162 ciclos de ICSI como en 97 ciclos de IAC, son prácticamente idénticas.

Esto hace pensar, que los resultados obtenidos, no son dependientes de la TRA utilizada (IAC o ICSI), sino de la repercusión de la toma de antioxidantes.

Así, la tasa de aborto en controles fue idéntica (22.2%), tanto en ICSI como en ciclos IAC, y dentro de la normalidad, comparando con lo observado en gestaciones espontaneas normales.

*La tasa de aborto con **antioxidante único** fue muy similar a los controles:*

20% tras ICSI y 25% tras IAC.

*Pero lo llamativo, inesperado, y hasta cierto punto preocupante, fue observar una tasa de aborto muy elevada tras **antioxidantes combinados**, en todos los ciclos de TRA: **44.4% tras ICSI y 41.6% tras IAC.***

*Estos resultados, aunque llamativos, **no son significativos**, probablemente porque el tamaño muestral no es muy elevado (76 embarazos y 23 abortos).*

Pero la enorme coincidencia de porcentajes en técnicas de TRA tan dispares como IAC e ICSI, responsabilizan e implican de algún modo, a los antioxidantes combinados, en estos resultados.

No hay que olvidar que, *Cochrane* solo encontró en 48 trabajos, 8 abortos, y lógicamente concluyó que en ciclos de reproducción asistida, no existen estudios suficientes que analicen la tasa de aborto tras tomar antioxidantes vs control, y no pudieron concluir nada con un nivel de evidencia muy bajo.

Pero tras observar nuestros resultados, y compararlos con Azizollahi, vemos que ellos también observaron una tasa de aborto muy elevada, del 31.8%, en varones con fragmentación de DNA y que, casualmente o no, también tomaron antioxidantes combinados de 60 días a 365 días (media de 130 días), antes de realizarse un ciclo de FIV-ICSI.

Es llamativo observar las coincidencias metodológicas y de resultados de este trabajo con el nuestro en:

- *Son ciclos de FIV-ICSI: ellos 62, nosotros bastantes más, 162.*
- *Antioxidantes combinados en ambos estudios.*
- *Duración del tratamiento: ellos media de 130 días; nosotros 135 días.*

Resultados a debatir con otros investigadores

- *Tasa de nacido vivo: ellos 24.2%, nosotros 23.3%.*

Este trabajo de Azizollahi de 2013 (97), no fue incluido en la revisión *Cochrane*, probablemente porque no tenían grupo control, solo fue realizado con antioxidantes.

¿Aporta la literatura alguna explicación ante este inesperado pero muy relevante hallazgo?

En condiciones normales el aparato genital masculino tiene un potente sistema de defensa antioxidante, pero si son excesivos los niveles de moléculas pro-oxidativas en el aparato genital masculino, esas defensas pueden ser perjudiciales y potencialmente productoras de infertilidad masculina.

El *sinergismo* se produce cuando dos o más antioxidantes presentes en un sistema muestran un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus acciones individuales. En cuanto a la *potenciación de sus acciones*, la literatura recoge ampliamente el efecto sinérgico entre el selenio y la vitamina E.

Dos recientes revisiones clínicas sobre tratamientos con antioxidantes en la infertilidad masculina, Gharagozloo 2011 (83), y Lombardo 2011 (105), advierten de que cuando se utilizan antioxidantes combinados a altas dosis, se pueden aumentar los riesgos derivados de una pérdida de las fisiológicas y esenciales especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual afectaría al proceso fisiológico de la capacitación espermática y a interferir en la reacción acrosómica, dificultando la fecundación.

Altas dosis de antioxidantes deberían ser evitadas debido a los posibles efectos adversos resultantes.

Por ejemplo, altas dosis de vitamina C reducen los puentes disulfuro en la protamina de la cisteína y consecuentemente la descondensación del ADN en espermatozoides.

El selenio a altas dosis, reduce significativamente el número de espermatozoides móviles en hombres fértiles posiblemente a través de modificaciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas (83).

Estos antioxidantes a altas dosis tienen la capacidad de interferir en el proceso esencial de la compactación de la cromatina espermática formando puentes disulfuro entre los grupos -SH de las protaminas enriquecidas con cisteína.

Estos antioxidantes, aunque pueden mejorar algunas fracciones del daño oxidativo (como la fragmentación del DNA), pueden también, combinados y a altas dosis, alterar la descondensación nuclear de la cromatina, situación que ya ha sido observada en otros ensayos clínicos, Menezo 2007 (106).

- Alvarez (32) no recomienda asociar DHA y EPA (aceites de pescado) o ácido linoleico, ya que podrían interferir el efecto antiinflamatorio del DHA. Además, comentan que el aceite de pescado puede contener trazas de metales pesados que actúen como catalizadores de reacciones mediadas por radicales libres, de consecuencias desconocidas.
- Bermejo-Bescós (114) lidera un grupo de investigadores farmacólogos, que realizaron su estudio en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y lo publicaron muy recientemente, en 2014, estudiando la actividad de los antioxidantes in vitro. Evalúan la actividad antioxidante de los antioxidantes utilizados en nuestro estudio: GestaDHA® y Andromás®. Los datos se obtuvieron de dos lotes diferentes (n=5 por lote). El suplemento Andromás® mostró una actividad antioxidante significativa muy elevada ($p < 0.05$) en el ensayo ORAC, con índices ORAC de 0.24 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ suplemento, valor considerado en la literatura como muy antioxidante. El más antioxidante fue el Andromás® (0.24) y el menos, Gesta DHA® (0.12), con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.05$). Respecto a la valoración por el método DPPH, Andromás® fue de nuevo el más antioxidante comparando con un control. Gesta DHA® no presentó actividad captadora de este radical.

Este estudio es el primero en evaluar la actividad antioxidante de estos preparados comerciales, que fue muy elevada para antioxidantes combinados (Andromás® y Seidiferti®), y menos elevada para el antioxidante único Gesta DHA®. Los autores concluyen que hay una necesidad emergente de realizar estudios clínicos controlados y randomizados que puedan poner de manifiesto la eficacia clínica de estos suplementos nutricionales sobre la fertilidad masculina.

El DHA actúa como un agente antiinflamatorio y antioxidante, por lo que, debería prevenir, al menos en parte, el daño de membrana y de ADN que se observa en espermatozoides eyaculados. Esto vendría condicionado no solo por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, sino también por la facilidad con la que el DHA cruza la barrera hematotesticular dada su alta hidrofobicidad y movilidad molecular (31).

Con nuestro estudio, hemos pretendido intentado colaborar clínicamente y comprobar todas las posibles consecuencias seminales y gestacionales de estos hallazgos interesantísimos observados in vitro.

Coincidimos plenamente, clínicamente, con los hallazgos observados in vitro por este grupo investigador. La motilidad, que puede ser la expresión máxima de la acción antioxidante sobre el espermatozoide, fue superior tras tratamiento con Andromás® respecto a Gesta DHA®, tanto en varones con astenospermia leve como severa. La tasa de embarazo bioquímico, clínico y de RNVS también fue superior con antioxidantes combinados.

- De Lamirande (54) y Zini (52) manifiestan tras sus investigaciones que, las concentraciones de ROS en semen, no deben ser suprimidas completamente por los antioxidantes orales, ya que esto condicionaría una alteración en las funciones espermáticas normales, como la capacitación espermática y su hiperactivación, que precisan de unas cantidades mínimas pero necesarias de ROS.
- Dattilo y cols publican en 2014 (91) un estudio que es el primero en insistir en utilizar los llamados, *antioxidantes “suaves”* como suplementos nutricionales, basado en el llamado “ciclo de un carbono”. Nos están

informando que no todos los antioxidantes se pueden combinar sin más, sino que unos son más suaves que otros.

Es un método alternativo terapéutico, basado en no dañar el sistema homeostático del cuerpo humano. Un ataque oxidativo, puede ser neutralizado por el metabolismo endógeno, por medio del agente reductor universal, la glutatión reductasa (GHS). Su síntesis se produce a través de la trans-sulfuración de la homocisteína, la cual se origina a través del llamado “ciclo de un carbono”. Un soporte nutricional oral que active el “ciclo de un carbono” debe contener: todas las vitaminas B (B2, B3, B6, B12 y B9) fundamentales para sintetizar homocisteína, N-acetilcisteína y/o cistina, que es el único precursor oral biodisponible para la síntesis de GHS, y zinc, cofactor esencial para activar las dos llaves enzimáticas. El zinc y la vitamina B9, administrados oralmente, aumentan el contenido de protamina espermática y potencian la integridad del acrosoma. La N-acetilcisteína es soluble, fácilmente absorbida y transformada intracelularmente en cisteína. Esta sustancia mejora los parámetros seminales y el estado oxidativo en varones con infertilidad masculina (88). La vitamina B coadministrada junto al zinc a dosis de 20mg/día, es absorbida intracelularmente y mejora la motilidad espermática y su capacidad fertilizante. Para ellos, suficiente con: vitaminas B, N-acetilcisteína y zinc.

- Mortimer y cols (92) insisten en que, para definir que una sustancia (en este caso, los antioxidantes), es “sana para el espermatozoide”, tiene que cumplir el criterio de que la función espermática NO esté afectada negativamente por esa sustancia, concretamente: la función endocrina del varón, la producción espermática (número y morfología), la motilidad espermática, el DNA espermático, la fertilización, la división y calidad embrionaria, la tasa de embarazo, el grado de aborto, y el nacimiento de un niño vivo y sano. Si se confirmara con estudios con un mayor número de embarazos, una elevada tasa de aborto con antioxidantes combinados, podríamos decir que estas sustancias no son sanas para el espermatozoide.

Resultados a debatir con otros investigadores

La elevada tasa de aborto observada en nuestro estudio, aunque no significativa, abre una nueva línea de investigación, sobre la posible acción no favorable que estos antioxidantes que llamamos combinados, pueden tener sobre el espermatozoide.

Al no haber estudios específicos que analicen el efecto de las dosis antioxidantes y los tiempos de tratamiento, nos ha hecho reflexionar sobre que este efecto abortivo embrionario, pueda ser consecuencia más que de la combinación de diversas sustancias antioxidantes, del efecto pro-oxidativo o altamente oxidativo, obtenido de la sumación de dosis proporcionadas por diversas sustancias, todas ellas con acción antioxidante, originando un efecto acumulativo altamente pro-oxidativo.

En otras palabras, las sustancias llamadas antioxidantes combinados, podrían denominarse, “suplementos con altas dosis antioxidantes”, proporcionadas por la sumación de lo aportado por cada sustancia antioxidante.

Por otra parte, al no ser significativos estos resultados, podemos manifestar que son, en un principio, únicamente observacionales, por lo que creemos necesarios estudios muy bien diseñados, con mayor número de casos, que confirmen o desmientan estas observaciones iniciales.

CAPITULO 2.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS NACIMIENTOS Y DE LOS NACIDOS VIVOS SANOS TRAS IAC E ICSI EN TODOS LOS GRUPOS CONTROLES Y ANTIOXIDANTES

De un total de **259 ciclos de TRA**, nacieron **54 niños vivos sanos**, **38 tras ICSI y 16 tras IAC**.

Si recordamos que en el meta-análisis Cochrane de 2014, que seleccionaron todo lo publicado bien diseñado existente en la literatura, recogieron únicamente un número de 44 nacidos vivos sanos en 277 parejas con y sin TRA, nuestro trabajo realizado en un único centro, se convierte en primicia, con el mayor número de casos de nacidos vivos analizados.

Del grupo control, sin antioxidantes, nacieron 23 (7 tras IAC y 16 tras ICSI) y con antioxidantes nacieron 31 (9 tras IAC y 22 tras ICSI).

Todos los niños nacieron en torno a la semana 38, los pesos alrededor de 3000 gramos, el tipo de parto (eutócico o cesárea) fue similar.

No hubo diferencias significativas en ningún parámetro analizado: semanas de gestación, peso, sexo, y tipo de parto (vaginal eutócico o distócico, o cesárea), comparando controles con antioxidantes.

Anecdóticamente, hubo en los nacidos tras ICSI, más niños que niñas (29 vs 9), pero sin significación estadística.

COMENTARIOS FINALES:

1. Hasta ahora, la mayoría de estudios contenían defectos en la metodología, imprecisiones, gran heterogeneidad, y eran muestras pequeñas.

Por todo ello, las evidencias obtenidas en general, eran de un grado “bajo” o “muy bajo”.

Nuestro estudio, metodológicamente bien diseñado, homogéneo, unicéntrico, y con un tamaño muestral adecuado, creemos que aporta suficiente calidad para que sus resultados sean considerados válidos dentro de la comunidad científica.

2. No existían estudios comparativos bien diseñados, antioxidante vs antioxidante (head to head), para valorar si un antioxidante es más efectivo que otro.

No había prácticamente ningún estudio útil comparativo, entre antioxidante único vs combinados.

Hemos podido extraer conclusiones comparativas de antioxidantes vs antioxidantes, que hasta ahora eran insuficientes para el análisis.

3. Respecto a aclarar los contradictorios resultados descritos en la literatura, en cuanto a si estas sustancias mejoran o no la calidad espermática seminal, respecto a concentración y motilidad progresiva espermática, no podemos concluir nada de modo significativo, aunque la motilidad se incrementa notablemente con antioxidantes, sobre todo combinados y este efecto es independiente del tiempo de tratamiento y de la edad del paciente.

4. Respecto a utilizar antioxidantes en varones con astenospermia idiopática como única causa de esterilidad, y que precisaban de Técnicas de Reproducción Asistida, las evidencias existentes eran muy escasas y no concluyentes, que precisaban de estudios bien diseñados, controlados, con un número amplio de parejas, randomizados, y que expresaran sus resultados con tasas de embarazo clínico y de nacido vivo, para poder clarificar el papel de los antioxidantes sobre todo en programas de Reproducción Asistida.

Nuestro estudio confirma un aumento significativo de la tasa de embarazo bioquímico con antioxidantes, tanto único como combinados, respecto a controles sin tratamiento.

También hemos observado un aumento, aunque no significativo, de las tasas de embarazo clínico y de recién nacido vivo sano con antioxidantes, tanto único como combinados, comparando con controles que no toman nada, tanto en IAC como en ICSI.

5. *No existían en la literatura estudios que analizaran la tasa de aborto tras tomar antioxidantes comparando con controles, en ciclos de TRA, y mucho menos comparando antioxidantes entre sí.*

Nuestros inesperados y sorprendentes resultados, respecto a obtener una tasa de aborto tan elevada, aunque no significativa, observada con antioxidantes combinados y no vista con antioxidante único, tanto en IAC como en ICSI, dan una voz de alarma, sobre el importante efecto prooxidativo que pueden tener estas sustancias que combinan y suman diversos antioxidantes con mecanismos de acción dispares entre sí.

Este hallazgo precisa confirmación con estudios en este sentido con mayor número de casos.

6. *De nuestro estudio se desprende que todos los antioxidantes no son iguales. Los buenos resultados obtenidos con un antioxidante único a base únicamente de DHA y a dosis suaves, respecto a tasa de embarazo evolutivo y de recién nacido vivo sano, y con una baja tasa de aborto, similar al grupo control que no toma nada, sugiere que quizás es suficiente para mejorar el estrés oxidativo del espermatozoide, con asociar pocos antioxidantes y a dosis no elevadas.*

7. *No hemos apreciado efectos adversos generales secundarios a la toma de antioxidantes. Lo más destacable, en los combinados, el intenso sabor incluso desagradable a pescado y mínimas alteraciones gastrointestinales, que nunca obligaron a suspender el tratamiento.*

8. *Concluimos desde un punto de vista práctico, que los clínicos podemos considerar recomendar la toma de antioxidantes por los varones subfértiles, en*

Resultados a debatir con otros investigadores

parejas que desean concebir, como parte de un programa de Reproducción Asistida, ya que aumenta significativamente la tasa de embarazo bioquímico y en menor grado, la de recién nacido vivo sano.

Sin embargo, a estas parejas hay que advertirlas de que se necesitan mas estudios que precisen con más exactitud, el perfil de potenciales efectos adversos gestacionales (aborto), observada únicamente con antioxidantes combinados.

CONCLUSIONES

1. La tasa de recién nacido vivo sano aumenta con la toma de antioxidantes, tanto único a base de ácido graso omega-3 DHA como combinados, comparando con los controles, tanto en astenospermia leve (realizando ciclos de IAC) como severa (realizando ciclos de ICSI), sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo.
2. La tasa de embarazo bioquímico aumenta significativamente con la toma de antioxidantes, tanto único a base de ácido graso omega-3 DHA como combinados, comparando con los controles, tanto en astenospermia leve (realizando ciclos de IAC) como severa (realizando ciclos de ICSI).
3. No se puede concluir nada con carácter significativo, respecto a las modificaciones en la concentración y en la motilidad progresiva espermática, después de la toma de antioxidantes tanto único a base de ácido graso omega-3 DHA en varones con astenospermia leve, ni tras combinados en los casos de astenospermia severa. Únicamente observamos un aumento importante de la movilidad progresiva espermática tras tratamiento, sobre todo con antioxidantes combinados.
4. En los casos de astenospermia severa tras realizar ICSI, los antioxidantes, tanto único a base de ácido graso omega-3 DHA como combinados, no inducen ningún cambio significativo en los parámetros de laboratorio embrionarios: tasa de fecundación, tasa de implantación y grado de calidad embrionaria, comparando con controles que no toman nada.
5. No se observan efectos adversos significativos derivados de la toma de terapia antioxidante, tanto único a base de ácido graso omega-3 DHA como combinados, que obliguen a suspender el tratamiento.
6. Se observa una elevada tasa de aborto, únicamente en embarazos conseguidos con antioxidantes combinados, en todos los casos tratados de astenospermia idiopática, tanto leve como severa y tanto en IAC como en ICSI, pero este hallazgo no ha sido estadísticamente significativo.
7. Esta importante observación precisa y obliga a diseñar nuevos estudios randomizados entre antioxidantes únicos y combinados, o entre antioxidantes suaves a bajas dosis y combinados a altas dosis, que consigan un mayor

Conclusiones

número de embarazos, que aclaren si la sobredosificación oxidativa puede ser nociva sobre la calidad del espermatozoide, induciendo anomalías embrionarias que finalizarían en aborto.

Con lo cual, ante la hipótesis inicialmente formulada:

El tratamiento oral con antioxidantes ácidos grasos únicos omega 3 o combinados, administrado a varones subfértiles diagnosticados de astenospermia idiopática leve o severa, mejora la concentración y motilidad espermática, y aumenta la tasa de embarazo y de niño nacido vivo sano, en parejas estériles que precisan de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), bien Fertilización In Vitro-ICSI (FIV-ICSI) o Inseminación Artificial Conyugal (IAC).

Podemos concluir:

El tratamiento oral con antioxidantes ácidos grasos únicos omega 3 o combinados administrado a varones subfértiles diagnosticados de astenospermia idiopática leve o severa en parejas estériles que precisan de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), bien Fertilización In Vitro-ICSI (FIV-ICSI) o Inseminación Artificial Conyugal (IAC):

- *No mejora la concentración espermática.*
- *Mejora la motilidad espermática, aunque no significativamente.*
- *Aumenta significativamente la tasa de embarazo bioquímico en todos los casos de astenospermia tanto leve como severa.*
- *La tasa de embarazo clínico y de recién nacido vivo y sano, en todos los casos de astenospermia tratados, también aumenta pero no significativamente*

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- (1) Mazarrasa Alvear L, Gil Tarragatos S. Salud sexual y reproductiva. En: Ministerio de Sanidad y Consumo, Observatorio de Salud de la Mujer, Universidad Complutense de Madrid, editores. Programa de formación de formadores/as en perspectiva de género y salud.2006:1.
- (2) López Villaverde V. La Infertilidad en España: Análisis de la evolución de los indicadores demográficos recogidos en España. Fertilidad e infertilidad humanas. En: Matorras R. Libro Blanco Sociosanitario. “La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas”. Las Matas (Madrid): Imago Concept & Image Development;2011.p. 53-70.
- (3) Ohannessian A , Gamberre M, Agostini A.Epidemiología de la fertilidad. EMC - Ginecología-Obstetricia.2014;50(3):1-8.
- (4) Matorras R. Fertilidad e infertilidad humanas. En: Matorras R. Libro Blanco Sociosanitario. “La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas”. Las Matas (Madrid): Imago Concept & Image Development;2011.p. 31-42.
- (5) Ballesta Ballester FJ. El equívoco de la esterilidad:¿enfermedad o manipulación?. Revista de Bioética y Derecho.2011;23: 21-34.
- (6) García Navas R, Maganto Pavón E, García-Ortells D, Gómez García I, Sanz Mayayo E, Escudero Barrilero A. La infertilidad y el varicocele a través de la historia. Arch. Esp. Urol.2004;57(9):876-882.
- (7) Mendiola J, Ten J, Vivero G, Roca M, Bernabeu R. Esterilidad y Reproducción Asistida: Una perspectiva histórica. Rev. Iber. Fert. 2005;22(1):15-22.
- (8) Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility (Review). The Cochrane Collaboration.2012:1-145.
- (9) Jalón Monzón A, Martín Benito JL, Álvarez Múgica M, García Rodríguez J, Fernández JM. Infertilidad masculina. SEMERGEN.2006;32(5):223-32.
- (10) Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G et al.EAU Working Group on Male Infertility. European Association of Urology

Bibliografía

Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. European Urology.2012;62:324-332.

(11) Mallok A, Flores-Sánchez RM, Alonso-Rodríguez CA, Martínez-Sánchez G. Lack of Redox balance in male sterility. Revista Cubana de Farmacia.2011;45(2):283-296.

(12) Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z, Krausz C. Guía clínica sobre la infertilidad masculina. European Association of Urology.2010:907-980.

(13) Teppa-Garrán A, Palacios-Torres A. Evaluación actual de la infertilidad masculina. Invest Clin.2004;45(4):355 - 370.

(14) Fernández Martos BF. Sterility and Sports. Rev.Iber. Fert Rep Hum.2012;29:81-88.

(15) López MJ, Urbano A, Cárdenas M. Manual de laboratorio para el análisis del semen.1ª edición. OmniaScience (Omnia Publisher SL);2012.

(16) Hernández-Matos Y, Delgado-Roche L, López-Pérez R, Martínez-Sánchez G, Mallok A. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. Revista de Endocrinología y Nutrición.2010;18(3):153-158.

(17) Brugo Olmedo S, Clamera, JC, González O, Deparci A, Verdinelli J, Casal JM et al. La morfología espermática y su importancia como diagnóstico de capacidad fertilizante. Desarrollo de un nuevo método de valoración por Video-Imágenes y su aplicación clínica. Rev. Arg. de Urol.1995;60(1):35-56.

(18) Zalata A A, Christophe A B, Christophe E, Schoonjans F, Comhaire F H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. Mol Hum Reprod.1998;4(2):111–118.

Bibliografía

(19) Oborna I, et al. Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Hum Reprod.*2010;25(2):308–316.

(20) Poirot C, Cherruau B. Infertilidad masculina. Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím Clín Latinoam.*2005;39 (2):225-41.

(21) López Villaverde V. Epidemiología de la esterilidad. Influencia de los factores ambientales. *Rev.Iberoam. Fert .Rep. Hum.*2014;31(2).

(22) Fernández-Cabrera MF, Olea N. The role of lifestyle and exposure to endocrine disruptors in male reproductive health.*Rev.Iberoam. Fert. Rep. Hum.*2012;29:12-16.

(23) Villa-Arcila N A, Ceballos-Márquez A. Radicales libres e infertilidad en el macho. *Vet.zootec.*2007;1(2):87-97.

(24) Pereira G, et al. Relación entre indicadores bioquímicos de estrés oxidativo, lípidos y lipoproteínas en pacientes infértiles. *Rev Cubana Invest Biomed.*2003;22(2):95-100.

(25) Tortolero I, Arata-Bellabarba G, Alfonso Osuna J, Gómez R, Regadera J. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Rev Venez Endocrinol Metab.*2005;3(3):12-19.

(26) Venereo Gutiérrez J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.*2002;31(2):126-33.

(27) Céspedes Cabrera T, Sánchez Serrano D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol.*2000;14(1):55-60.

Bibliografía

(28) Lázaro E, Zayas A, Monzón Benítez G, Peláez Yáñez L, Quintero Pérez Y. Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed.*2000;19(3):202-5.

(29) Quintero WP, et al. Efecto del estrés oxidativo sobre la calidad del semen en pacientes infértiles con leucocitospermia. *Rev Cubana Invest Biomed.*2000;19(3):183-85.

(30) Mendoza N. Antioxidantes y fertilidad masculina.*Rev.Iberoam. Fert. Rep. Hum.*2012;29.137-144.

(31) Alvarez JG. Utilidad del ácido docosahexaenoico en el tratamiento de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl.*2011;9(4):138-144.

(32) Alvarez Sedó C, Uriondo Boudri H, Janny S, Nodar F, Papier S, Chillik C. La edad masculina y su relación con los niveles de apoptosis y peroxidación lipídica en espermatozoides de varones que realizan tratamientos de TRA. *Reproducción.*2012;27:71-78.

(33) Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis S. Utility of antioxidantes during assisted reproductive techniques:an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology.*2014;12:112.

(34) Valenzuela A, Nieto MS. Docosahexanoic acid (DHA) in fetal development and infant nutrition. *Rev. Méd. Chile.*2001;129(2):1203-1211.

(35) Haidl G, Opper C. Los cambios en los lípidos de membrana y la anisotropía en espermatozoides humanos durante la maduración del epidídimo. *Hum Reprod.*1997;12(12):2720-3.

(36) Safarinejad MR, Safarinejad S. The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. *Asian J Androl.*2012;14:514–515.

Bibliografía

(37) Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr.*2010;29(1):100-5.

(38) Ollero M, Powers RD, Alvarez JG. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev.*2000;55(3):326-34.

(39) Barbosa KB, Bressan J, Zulet MA, Martínez Hernández JA. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An Sist Sanit Navar.*2008;31:259-80.

(40) Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad-Med.*2007;53:207-13.

(41) Agarwal, Lucky H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility.*2010;13(4):217–225.

(42) Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.*2002;20:2575–601.

(43) Ceriello A. Possible role of stress oxidative in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care.*2008;31(2):181-4.

(44) Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res.*2007;56:671-84.

(45) Van Leeuwen R, Boekhoorn S, Vingerling JR, Witteman JC, Klaver CC, Hofman A, et al. Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration. *JAMA.*2005;294:3101-7.

Bibliografía

(46) De la Fuente M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr.*2002;56(3):5-8.

(47) Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl.*2008;29:488-98.

(48) Fung TT, Hunter DJ, Spiegelman D, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. Vitamins and carotenoids intake and the risk of basal cell carcinoma of the skin in women (United States). *Cancer Causes Control.*2002;13:221-30.

(49) Margaritis I, Rousseau AS. Does physical exercise modify antioxidant requirements?. *Nutr Res Rev.*2008;21:3-12.

(50) Baker DL, Krol ES, Jacobsen N, Liebler DC. Reactions of beta-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/antioxidant effect. *Chem Res Toxicol.*1999;12:535-43.

(51) Rahman I. Antioxidant therapies in COPD. *Int J Chron Obstruct pulmon Dis.*2006;1:15-29.

(52) Zini A, Al-Hathal NA. Antioxidant therapy in male infertility: fact o fiction?. *Asian J Androl.*2011;13:374-381.

(53) Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl.*2011;13:43-52.

(54) De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.*1997;2:48-54.

(55) Martínez-Ramos EB, García-Águila CA , Castro-Juárez JC , Coronel-García R , Duque-Bautista H , Ordaz-Zurita F , et al. Recomendaciones nutricionales durante la etapa adulta para hombres y mujeres en edad reproductiva. *Revista Médica MD.*2014;6(1):42-49.

Bibliografía

(56) Torres M, Márquez M, Sutil de Naranjo R, de Yépez C, Leal de García M, Muñoz M, et al. Aspectos Farmacológicos relevantes de las Vitaminas Antioxidantes (E, A y C). Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica.2002;21(1):22-27.

(57) Ross C , Morriss A, Khairy M , Khalaf Y , Braude P , Coomarasamy A et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. Reproductive BioMedicine Online.2010; 20: 711– 723.

(58) Wang JX, Norman RJ, Kristiansson P. The effect of various infertility treatments on the risk of preterm birth. Hum Reprod.2002;17:945-9.

(59) Omu AE, Dashti H, Al-Othman S. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulphate: andrological, immunological and obstetric outcome. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol.1998;79(2):179–84.

(60) Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Mathew TC. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. Medical Principles and Practice.2008;17(2):108–16.

(61) Galatioto GP, Gravina GL, Angelozzi G, Sacchetti A, Innominato PF, Pace G, et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele?. World J of Urol.2008; 26(1):97–102.

(62) Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF/ICSI treatment. The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology.2007;47:216–21.

(63) Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. Fertil Steril.1995;64(4):825–31.

Bibliografía

(64) Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.*1996;17(5):530–7.

(65) Dawson EB, Harris WA, Powell LC. Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Rev Nutr Diet.*1990;62:1–26.

(66) Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.*2005;26(3):349–53.

(67) Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl.*2003;49(2):83–94.

(68) Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study [see comment]. *Hum Reprod.*1999;14(4):1028–33.

(69) Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol.*1998;82(1):76–80.

(70) Shekelle P, Hardy ML, Coulter I, Udani J, Spar M, Oda K, et al. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *Evid Rep Technol Assess (Summ).*2003;75:1-3.

(71) Mata González E, Mach N. La ingestión de la L-carnitina puede reducir la infertilidad masculina. *Rev Esp Nutr Comunitaria.*2013;19(3):172-179.

(72) Sigman M, Glass S, Campagnone J, Pryor JL. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.*2006;85(5):1409–14.

(73) Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril.*2005;84(3):662–71.

(74) Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxiam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia [see comment]. *J Androl.*2004;25(5):761–70.

(75) Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia [see comment]. *Fertil Steril.*2004;81(6):1578–84.

(76) Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.*1989;23(1):77-90.

(77) Safarinejad MR and Safarinejad S. Efficacy of Selenium and/or N-Acetyl-Cysteine for Improving Semen Parameters in Infertile Men: A double blind, placebo controlled, randomized study. *The Journal of Urology.*2009;181:741-751.

(78) Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/ antioxidant status. *Urology.*2009;74(1):73–6.

(79) Nadjarzadeh A, Shidfar F, Amirjannati N, Vafa M.R, Montevalian S.A, Gohari M.R, et al. Effect of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia.*2014;46:177-183.

Bibliografía

(80) Mancini A, et al. Coenzyme Q 10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. *J Androl.*1994;15(6):591-4.

(81) Cruz RM, González J, Sánchez P. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutr Hosp.*2013;28(1):6-15.

(82) Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant “Astaxanthin” treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian Journal of Andrology.*2005;7(3):257–62.

(83) Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod.*2011; 26(7):1628–1640.

(84) Tesarik, J., Thebault, A., & Testart, J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod.*1992; 7:1257–1263.

(85) Okada, H., Tatsumi, N., Kanzaki, M., Fujisawa, M., Arakawa, S., & Kamidono, S. Formation of reactive oxygen species by spermatozoa from asthenospermic patients: response to treatment with pentoxifylline. *The Journal of Urology.*1997; 157:2140–2146.

(86) Klebanov, G. I., Kapitanov, A. B., Teselkin YuO, Babenkova, I. V., Zhambalova, B. A., Lyubitsky, O. B., et al. The antioxidant properties of lycopene. *Membr Cell Biol.*1998;12:287–300.

(87) Gupta, N. P., & Kumar, R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility – a preliminary report. *International Urology and Nephrology.*2002; 34:369–372.

(88) Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/ antioxidant status. *Urology.*2009;74(1):73–6.

Bibliografía

(89) Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia [see comment]. *Fertil Steril*.2004;81(6):1578–84.

(90) Botella-Llusiá J. Measurement of linear progression of the human spermatozoon as an index of male fertility. *Int J Androl*.1956;1:113-130.

(91) Dattilo M, Cornet D, Amar E, Cohen M, Menezo Y. The importance of the one carbón cycle nutritional support in human male fertility: a preliminary clinical report. *Reprod Biol Endocrinol*.2014;12(71):1-9.

(92) Mortimer D, Barrat CLR, Bjorndahl L, de Jager C, Jequier AM, Muller CH. What should it take to describe a substance or product as “sperm-safe”.*Hum Reprod Update*.2013;19(1):1-48.

(93) Showel MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. The Cochrane Library Database of Systematic Reviews.2011, issue 1.Art. N: CD007411.

(94) Showell MG, Mackenzi-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.2014, Issue 12. Art. N: CD007411.

(95) Attallah D, El-Nashar IH, Mamhmoud R, Shaaban OM, Salman SA. N-acetylcysteina prior to intrauterine insemination in couples with isolated athenozospermia: a randomized controlled trial . *Fertil Steril*.2013;100, issue 3 Suppl: S462.

(96) Martínez-Soto JC, Landeras J, Nicolas M, Fernandez L, Albero P, Domingo JC. Domingo JC. Effect of dietary DHA supplementation on sperm quality.2011; *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT01368484.

Bibliografía

(97) Azizollahi G, Azizollahi S, Babaei H, Kianinejad M, Baneshi MR, Nermatollahi SN. Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. *J Assist Reprod Genet.*2013;30:593-599.

(98) Zavaczki Z, Szollosi J, Kiss S, Koloszar S, Fejes I, Kovacs L, Pal A. Magnesium-orotate supplementation for idiopathic infertile male patients: a randomized, placebo-controlled clinical pilot study. *Magnes Res.*2003;16(2):131–6.

(99) Morgante G, Scolaro V, Tosti C, Di Sabatino A, Piomboni P, De Leo V. Treatment with carnitine, acetyl carnitine, L-arginine and ginseng improves sperm motility and sexual health in men with asthenospermia. *Minerva Urol Nefrol.*2010;62(3):213-18.

(100) Agarwal A, Nallella K, Allamaneni S, Sid T. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online.*2004;8(6):616-27.

(101) Zhou X, Liu F, Zhai S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.*2007;16(1):383-90.

(102) Patel SR, Sigman M. Antioxidant therapy in male infertility. *Urol Clin North Am.*2008;35(2):319-30.

(103) Lafuente R, Gonzalez-Comadran M, Sola I, Lopez G, Brassesco M, Carreras R, et al. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Gen.*2013;30(9):1147-56.

(104) Kumalic SI and Pinter B. Review of Clinical trials in Effects of Oral Antioxidants on Basic Semen and Other Parameters in Idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia. *Biomed Research International.*2014;article ID 426951,11 pages.

Bibliografia

(105) Lombardo F, Samsone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl.*2011;13:690-697.

(106) Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clement P, Benkhalifa M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online.*2007;14:418-421.

(107) Nadjarzadeh A, Sadegui MR, Amirjannati N, Vafa MR, et al. Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in Idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia: A Randomized Double Blind, placebo Controlled Trial. *J Endocrinol Invest.*2011;224-228.

(108) Nadjarzadeh A, Shidfar F, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR, et al. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrology.*2013;46:177-183.

(109) Roqueta-Rivera M, Strius CK, Haschek WM, Akare SJ, Segre M, Brush RS, et al. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J Lipid Res.*2010;51(2):360-367.

(110) Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma and spermatozoa of normozoospermic vs asthenozoospermic males. *Lipids.*1999;34:793-9.

(111) Safarinejad MR, Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic antioxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo controlled randomised study. *Andrology.*2011;43:38-47.

Bibliografía

(112) Attaman JA, Toht TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, et al. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Hum Reprod.*2012; 27:1466-74.

(113) Anarte C, Domingo A, Calvo I, Presilla N, Aguirre O, Bou R, et al. Proper dietary supplementation may improve fatty acid composition and semen quality: A prospective, randomized, double-blind trial. *Fertil Steril.*2013;100:54.

(114) Bermejo-Bescós P, Cuadrado I, Ortega JC, De las Heras B. Evaluación de la actividad antioxidante de suplementos dietéticos utilizados para mejorar la fertilidad masculina. *Rev Iber Fert.*2014; 31(3):21-25.

(115) Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, Ricciardo G, Boscaro M, Lenzi A, Littarru G. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril.*2009;91(5):1785-92.

(116) Sigman M, Glass S, Campagnone J, Pryor JL. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 2006; *Fertil Steril* 85 (5), 1409-1414.

(117) Ghanem H, Shaeer O, El-Segini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.*2010;93(7):2232-2235.

(118) Wang YX, Yang SW, Qu CB, et al. L-carnitine: safe and effective for asthenozoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue.*2010;16(5):420-422.

(119) Busetto GM, Koverech A, Messano M, Antonini G, De Berardinis E, Gentile V. Prospective open-label study on the efficacy and tolerability of a combination nutritional supplements in primary infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia.*2012;84(3):137-14.

Bibliografía

(120) Abad C, Amengual MJ, Gosalvez J, Coward K, Hannaoui N, Benet J, Garcia-Peiro A, Prats J. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrology*.2013;45:211-216.

(121) Bardaweel SK. Alternative and antioxidant therapies used by a sample of infertile males in Jordan: a cross-sectional survey. *BMC Compl Altern Med*.2014;14(244):1-8.

(122) Gvozdjaková A, Kucharska J, Dubravicky J, Mojto V, Singh RB. Coenzyme Q10, alfa-tocopherol and oxidative stress could be important metabolic biomarkers of male infertility. *Dis Markers*.2015;ID 827941,6 pages.

(123) Paes de Almeida Ferreira D, Halpern G, De Cassia R, Setti A, Iaconelli A, Borges E. Food intake and social habits in male patients and its relationship to intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril*.2012;97(1):53-9.

(124) Comhaire FH, Declerck W. The benefit of nutraceutical food supplementation and antioxidants for the treatment of the infertile couple and in assisted reproduction. *Andrology* .2012;42:331-340.

(125) Ruiz-Luna AC, Salazar S, Aspajo NJ, Ribio J, Gasco M, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) increased litter size in normal adult female mice. *Reprod Biol Endocrinol*.2005;3:15.

(126) Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. *Lepidium Meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl*.2001;3:301-30.

(127) Clarke JF, Minouche ME, van Rumste, et al. Measuring outcomes in fertility trials: can we rely on clinical pregnancy rates?. *Fertil Steril*.2010;94:1647-51

ANEXOS

ANEXO I

Índice de Tablas

Tabla 1	Número de ciclos de TRA realizados tanto IAC como ICSI en los tres grupos de estudio: control, antioxidante único y antioxidantes combinados.	217
Tabla 2	Duración del tratamiento en días, valorando la duración mínima, la máxima y la media con la desviación típica ($p > 0.05$).	218
Tabla 3	Características de las parejas estudiadas en IAC.	252
Tabla 4	Comparación de los parámetros seminales entre grupos de estudio antes del tratamiento en parejas a las que se realizó IAC.	
Tabla 5	MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales según tipo de tratamiento en ciclos de IAC.	253
Tabla 6	MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales entre tratamientos único y combinado (head to head) en ciclos de IAC.	256
Tabla 7	Tasas Embarazo/ciclo en grupo Control y Antioxidantes en ciclos IAC.	259
Tabla 8	Tasas Embarazo/ciclo entre grupos Control y Tipo de Antioxidantes en ciclos IAC.	260
Tabla 9	Características de las parejas estudiadas en ICSI.	262
Tabla 10	Comparación Parámetros Seminales Pretratamiento según Grupos de Estudio en pacientes ICSI.	263
Tabla 11	MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos entre grupos en los parámetros seminales en ICSI.	265
Tabla 12	MGL: Medias (DT) y contrastes estadísticos en los parámetros seminales según tratamientos único combinado en ciclos de ICSI.	267
Tabla 13	Parámetros ovocitarios y embrionarios en todos los grupos: control y antioxidantes.	270

Tabla 14	Parámetros ovocitarios y embrionarios según grupos de estudio: control y antioxidantes, único y combinados.	272
Tabla 15	Tasas Embarazo/ciclo en grupos Control y Antioxidantes en ICSI.	273
Tabla 16	Tasas Embarazo/ciclo según Tipo de Antioxidante en ICSI.	274
Tabla 17	Tasa de aborto en TRA (IAC+ICSI) según antioxidantes vs control.	275
Tabla 18	Tasa de aborto en ICSI según antioxidantes vs control.	276
Tabla 19	Tasa de aborto en IAC según antioxidantes vs control.	276
Tabla 20	Resultados de la gestación, tipo de parto, peso y sexo de los recién nacidos según IAC vs ICSI y según control vs antioxidantes único o combinados (X y DS).	278

Índice de Figuras

Figura 1	Tasa bruta de natalidad en España (1995-2009).	29
Figura 2	Niveles de fertilidad global (nacimientos por mujer), todo el mundo y zonas principales, 1970 a 2015.	33
Figura 3	Niveles de prevalencia de los anticonceptivos (porcentaje) entre las mujeres casadas y en unión consensual, todo el mundo y regiones principales, 1970 a 2015.	35
Figura 4	Tipos de movilidad de los espermatozoides.	62
Figura 5	Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides.	64
Figura 6	Evolución de los valores de referencia del seminograma en las distintas ediciones de los manuales de la OMS.	65
Figura 7	Esquemas gráficos de los principales métodos de capacitación para recuperación de espermatozoides móviles.	68
Figura 8	Estructura del espermatozoide.	79
Figura 9	Estructura de un ácido graso saturado.	126
Figura 10	Estructura de un ácido graso insaturado.	126
Figura 11	Esquema de la formación de la serie omega-3 y omega-6.	127
Figura 12	Estructura del DHA.	151
Figura 13	Efecto de los Tipos de Tratamiento en relación a los Parámetros Seminales Concentración y Motilidad.	255
Figura 14	Efecto del tipo de tratamiento único y combinado en relación a los parámetros seminales.	258
Figura 15	Efecto de los Tipos de Tratamiento en relación a los Parámetros Seminales en ciclos de ICSI.	266
Figura 16	Efecto grupos de tratamiento único y combinado en relación a las parámetros seminales en ciclos de ICSI.	269