



TESIS DOCTORAL

**El complejo telomérico en células germinales y
no germinales y su relación con la infertilidad
masculina**

Autor:

Carlos Balmori Boticario

Director/es:

Dr. Juan Antonio García Velasco

Dra. M^a Elisa Varela Sanz

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2021



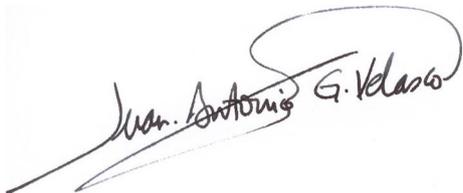
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dr. Juan Antonio García Velasco, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del departamento de Especialidades Médicas y Salud Pública, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y co-director de IVIRMA Madrid,

Certifica:

Que el trabajo titulado: **"El complejo telomérico en células germinales y no germinales y su relación con la infertilidad masculina"**, realizada por Don Carlos Balmori Boticario bajo mi supervisión, cumple todos los requerimientos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 20 de junio de 2021.





Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe

Dr. María Elisa Varela Sanz, Doctora en Biología e Investigadora Principal del Grupo de Telómeros en Reproducción del I.S. La Fe e IVIRMA Foundation,

Certifica:

Que Don Carlos Balmori Boticario ha realizado bajo mi codirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada **"El complejo telomérico en células germinales y no germinales y su relación con la infertilidad masculina"**. Tanto el trabajo de investigación como la memoria están concluidos y cumple los requisitos para su lectura y defensa ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 20 de junio de 2021

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por haber estado siempre apoyando todo lo que he hecho en mi vida profesional.

A mi director de tesis Juan Antonio García Velasco, por transmitir su tenacidad y sabiduría para hacer las cosas y por haber sido constante en mantenerme con ilusión para la realización de este trabajo.

A Elisa Varela, mi codirectora de tesis, por haber tenido paciencia infinita para enseñarme lo que significa la investigación y trabajar en un laboratorio, por sus innumerables gestiones en los centros donde se han realizado los experimentos de este trabajo y lo que significa no redirse antes las adversidades que muchas veces te encuentras en una investigación.

A Guillermo, Transi, Isabel, Alba, Lucía, Marta e Isabel por toda su ayuda en el laboratorio, habría sido imposible sin todo su trabajo, que hubiera llegado esta tesis a ver la luz.

A Alberto Pacheco, director del laboratorio del Andrología de IVI Madrid y todo su equipo por la ayuda en la recogida y procesamiento de todas las muestras.

A todo el equipo de enfermería de IVI Madrid por conseguir que el reclutamiento de pacientes y la entrega de muestras se hiciera adecuadamente.

A Monica Toribio coordinadora local de Investigación del grupo IVI Madrid por las miles de gestiones burocráticas que suponen un trabajo de investigación.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO	18
1.1.1. Embriología testicular.....	18
1.1.1.1. Etapa indiferenciada	18
1.1.1.2. Etapa diferenciada	19
1.1.1.3. Descenso de los testículos	20
1.1.2. Anatomía testicular	21
1.1.3 Fisiología espermática.....	22
1.1.3.1. Espermatogénesis	22
1.1.3.2. Maduración del espermatozoide en el epidídimo	24
1.1.3.3. Capacitación del espermatozoide	24
1.1.3.4. Regulación neuroendocrina.....	25
1.2. INFERTILIDAD.....	27
1.2.1. Definición de infertilidad	27
1.2.2. Infertilidad masculina	27
1.2.2.1. Concepto	27
1.2.2.2. Prevalencia	28
1.2.2.3. Etiología	29
1.2.3. Efectos en la reproducción asistida	29
1.2.4 Preservación de la fertilidad.....	30
1.3. TELÓMEROS.....	32
1.3.1. Estructura y función.....	32
1.3.2. Shelterina	33
1.3.3. Límite de Hayflick.....	34
1.3.4. Telomerasa. estructura y función	34
1.4. DISFUNCIÓN DE LOS TELÓMEROS.....	35
1.4.1. Telómeros envejecimiento y enfermedad	35

1.4.2. Telómeros e infertilidad masculina.....	36
1.4.2.1. Telómeros y espermatozoides.....	36
1.4.2.2. Longitud telomérica y herencia.....	36
1.4.2.1. Implicaciones sobre la fertilidad masculina	37
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
4. RESULTADOS	53
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PERSONAS RECLUTADAS	53
4.2. LONGITUD TELOMÉRICA EN SANGRE.....	53
4.3. VALORACIÓN DE TELÓMEROS CORTOS Y LARGOS EN SANGRE	55
4.4. LONGITUD TELOMÉRICA EN ESPERMATOZOIDES	56
4.5. VALORACIÓN DE TELÓMEROS CORTOS Y LARGOS EN ESPERMATOZOIDES.....	57
4.6. MEDIDAS DE PROTECCIÓN TELOMÉRICA.....	58
4.7. EFECTOS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN LA FERTILIDAD.....	59
4.7.1. Efecto de la longitud telomérica en la tasa de fecundación.....	60
4.7.2. Efecto de la longitud telomérica en la tasa de desarrollo a blastocisto.....	61
5. DISCUSIÓN.....	65
5.1. LONGITUD TELOMÉRICA EN CÉLULAS MONONUCLEARES	66
5.2. CUANTIFICACIÓN DE TELÓMEROS CORTOS Y LARGOS EN CÉLULAS MONONUCLEARES..	67
5.3. LONGITUD TELOMÉRICA EN CÉLULAS ESPERMÁTICAS	68
5.4. MEDIDA DE LA PROTECCIÓN TELOMÉRICA	69
5.5. EFECTO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN LA FERTILIDAD.....	71
6. LIMITACIONES	75
7. APLICACIONES	79
8. CONCLUSIONES	83
9. BIBLIOGRAFÍA	87
10. ANEXOS.....	105

ABREVIATURAS

A: Adenina

ABP: Androgen Binding Protein (Proteína fijadora de andrógenos)

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

Alt-NHEJ: Alternative non-homologous end joining (Unión de extremos no homólogos alternativa)

AMH: Hormona antimuleriana

ARN: Ácido Ribonucleico

ATM: Quinasa ataxia telangiectasia-mutada

ATR: Quinasa ataxia telangiectasia relacionada con Rad3

BSA: Bovine Serum Albumin

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

cADN: Cadena complementaria de ADN

CM: Célula mononucleada

c-NHEJ: Canonical/classical non-homologous end joining (Unión de extremos no homólogos clásica)

Cy3: Cyanina 3 (Cianina 3)

DAPI: 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride

Dkc1: Disquerina

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético

EPC: Edad Paterna de la Concepción

FIM: Factor Inhibidor de Müller

FISH: Fluorescence In Situ Hybridation (Hibridación in situ con fluorescencia)

FIV: Fecundación In Vitro

FSH: Hormona Foliculo Estimulante

G: Guanina

GAPGH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GnRH: Gonadotrophin-releasing hormone (hormona liberadora de gonadotropina)

GPC: Glicerofosfolina

HDR: Reparación dirigida por homología

HT-Q-FISH: High-Throughput Quantification by FISH (Hibridación in situ cuantitativa de alto rendimiento)

hTERT: Human Telomerase Reverse Transcriptase (Telomerasa transcriptasa inversa humana)

ICSI: Inyección intraplasmática

IDF: Index DNA fragmentation (Índice de fragmentación de DNA)

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

Kb: Kilobase

LH: Hormona Luteneizante

LHRH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone (hormona liberadora de hormona luteinizante)

LT: Longitud telomérica

LTE: Longitud telomérica de los espermatozoides

MicroTESE: Micro Testicular Sperm Extraction (Micro biopsia testicular)

NZ: Normozoospermia

NP: No progresivos

OAZ: Oligoastenozoospermia

OncoTESE: Oncological Testicular Sperm Extraction (Biopsia testicular oncológica)

PARP1: PoliADP-ribosa polimerasa 1

PBS: Phosphate Bufferes Saline (Tampón fosfato salino)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PGC: Primordial Germ Cell (Células Germinales Primordiales)

PKA: Proteinkinasa A

POT1: Protection Of Telomeres 1 (Proteína 1 protectora de telómeros)

PR: Progresivos

ROS: Reactive Oxygen Species

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa con

Transcriptasa Inversa)

SSC: Spermatogonial Stem Cells (Células madre espermatozóicas)

T: Tiamina

TERRA: Telomeric Repeat-containing RNA (ARN que contiene repeticiones teloméricas)

TERC: Componente RNA de Telomerasa

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase (Telomerasa transcriptasa inversa)

TESE: Testicular Sperm Extraction (Biopsia testicular)

TRF1: Telomere Repeat binding Factor 1 (Factor de unión a repeticiones teloméricas 1)

TRF2: Telomere Repeat binding Factor 2 (Factor de unión a repeticiones teloméricas 2)

TIN2: TRF1-Interacting Nuclear protein 2 (Proteína nuclear 2 que interactúa con TRF1)

TPP1: TIN2 (TRF1-interacting nuclear Protein)-Interacting Protein (Proteína 1 que interactúa con TIN2)

RAP1: Repressor/Activator Protein 1 (Proteína 1 represora/activadora)

ZP: Zona Pelúcida

1

INTRODUCCIÓN



La definición de salud reproductiva con sus características esenciales que diferencian ésta de los demás campos de la salud, fue consensuada en la Conferencia Internacional sobre la población y el Desarrollo del Cairo en 1994 y lo hace en los siguientes términos en sus párrafos 7.2 y 7.3 (1):

“La salud reproductiva es un estado general de bienestar físico, mental y social, y no de mera ausencia de enfermedades o dolencias, en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo y sus funciones y procesos.

En consecuencia, la salud reproductiva entraña la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos y de procrear, y la libertad para decidir hacerlo o no, cuándo y con qué frecuencia. Esta última condición lleva implícito el derecho del hombre y la mujer a obtener información sobre planificación familiar y su elección, así como a otros métodos para la regulación de la fecundidad que no estén legalmente prohibidos, y acceso a métodos seguros, eficaces, asequibles y aceptables, el ***derecho a recibir servicios adecuados de atención de la salud que permitan los embarazos y los partos sin riesgos y den a las parejas las máximas posibilidades de tener hijos sanos***. En consonancia con esta definición de salud reproductiva, la atención de la salud reproductiva se define como el conjunto de métodos, técnicas y servicios que contribuyen a la salud y al bienestar reproductivos al evitar y resolver los problemas relacionados con la salud reproductiva. Incluye también la salud sexual, cuyo objetivo es el desarrollo de la vida y de las relaciones personales y no meramente el asesoramiento y la atención en materia de reproducción y de enfermedades de transmisión sexual”. “La salud reproductiva está

fuera del alcance de muchas personas de todo el mundo a causa de factores como: los conocimientos insuficientes sobre la sexualidad humana y la información y los servicios insuficientes o de mala calidad en materia de salud reproductiva; la prevalencia de comportamientos sexuales de alto riesgo; las prácticas sociales discriminatorias; las actitudes negativas hacia las mujeres y las niñas; y el limitado poder de decisión que tienen muchas mujeres respecto de su vida sexual y reproductiva. En la mayoría de los países, los adolescentes son particularmente vulnerables a causa de su falta de información y de acceso a los servicios pertinentes. **Las mujeres y los hombres de más edad tienen problemas especiales en materia de salud reproductiva, que no suelen encararse de manera adecuada”.**

La imposibilidad de tener un hijo, en muchas ocasiones, plantea situaciones difíciles tanto a nivel personal como social. Las relaciones de pareja pueden verse afectadas por la imposibilidad de uno de los miembros para tener hijos, situación que puede provocar sensaciones de culpa o de defecto físico en la persona afecta o incluso éstas pueden ser esgrimidas como causa de repudio por el otro miembro de la pareja. Una pareja sin hijos en determinadas culturas se ve marginada de eventos religiosos o sociales lo que aumenta su aislamiento en la comunidad.

1.1. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

1.1.1. Embriología testicular

Los embriones tempranos poseen un sistema genital indiferenciado que está dotado de las estructuras necesarias para desarrollar su sexo. La diferenciación hacia un sexo u otro conlleva el predominio gradual de un componente y la desaparición de otro (3).

El sexo genético o cromosómico se determina en el momento de la fecundación y es el que determina que la gónada indiferenciada se convierta en ovario en la mujer y testículo en el hombre. El desarrollo de los órganos genitales durante la etapa embrionaria se produce en dos etapas:

Indiferenciada: idéntica para ambos sexos, se extiende desde la fecundación hasta la 7ª semana en embriones masculinos y hasta la 9ª a 10ª en embriones femeninos.

Diferenciada: distintas según el sexo cromosómico del embrión. El cromosoma Y a través del gen SRY situado en su brazo corto, es el inductor de la transformación de la gónada indiferenciada a testículo, su ausencia conlleva la formación del ovario.

1.1.1.1. Etapa indiferenciada

Las gónadas aparecen inicialmente como un par de eminencias longitudinales, los **pliegues o crestas genitales o gonadales**, que se forman por proliferación del epitelio superficial y la condensación del mesénquima subyacente. Las **células germinativas primordiales** solo aparecen en los pliegues genitales desde la sexta semana.

Las células germinales primordiales se observan en una etapa temprana del desarrollo entre las células endodérmicas de la pared del saco vitelino cerca de la alantoides. Emigran por movimientos ameboides a lo largo del mesenterio dorsal del intestino posterior y llegan a las gónadas primitivas (indiferenciadas) al comienzo de la quinta semana e invaden las crestas genitales en la sexta semana. Si no alcanzan a éstas, las gónadas no se desarrollan.

Por lo tanto, las células germinales primordiales tienen una influencia inductora sobre el desarrollo de la gónada en ovario o testículo. Poco antes y durante la llegada de las células germinales primordiales, el epitelio de la eminencia genital prolifera y las células epiteliales penetran en el mesénquima subyacente, donde forman cordones de forma irregular, los **cordones sexuales primitivos**. En embriones masculinos y femeninos, los cordones están unidos al epitelio superficial, y en esta etapa es imposible diferenciar la gónada masculina y la femenina. En consecuencia, se la llama **gónada indiferente**.

1.1.1.2. Etapa diferenciada

Si el embrión es genéticamente masculino, las células germinales primordiales tienen una dotación de cromosomas sexuales XY. Por influencia del gen SRY localizado en el cromosoma Y, que codifica el factor determinante testicular, los cordones sexuales primitivos siguen proliferando y se introducen profundamente en la médula gonadal para formar los **cordones testiculares o medulares** (4,5). Hacia el hilio de la glándula, los cordones se disgregan en una red de filamentos celulares diminutos que ulteriormente darán origen a los túbulos de la **red de Haller o rete testis**. Durante el desarrollo ulterior, una capa compacta de tejido fibroso, la túnica albugínea, separa a los cordones del testículo de la superficie epitelial (6).

En el cuarto mes, los cordones testiculares toman una forma de herradura y sus extremos se continúan con los de la rete testis. Los cordones testiculares están compuestos en este momento por **células germinales primordiales y células de sostén de Sertoli** derivadas del epitelio superficial de la glándula, debido a la activación del gen SOX9 (7, 8). Las **células intersticiales de Leydig**, descritas por primera vez en 1850 (9), se desarrollan a partir del mesénquima original de la cresta gonadal y se encuentran entre los cordones testiculares. Comienzan a desarrollarse poco después de iniciada la diferenciación de los cordones. En la octava semana de desarrollo, las células de Leydig empiezan a producir testosterona a partir del colesterol (10, 11), de esta forma, el testículo puede influir entonces en la diferenciación sexual de los conductos genitales y de los genitales externos. Los cordones testiculares se mantienen macizos hasta la pubertad, cuando se canalizan y dan origen a los **túbulos seminíferos**. Una vez que se ha producido su canalización, estos túbulos se unen a los de la rete testis, los cuales a su vez penetran en los **conductillos eferentes**. Los conductillos eferentes son las porciones remanentes de los túbulos excretores del sistema mesonéfrico y actúan como vínculo entre la rete testis y el conducto mesonéfrico o de Wolff, que recibe el nombre de **conducto deferente** (12).

1.1.1.3. Descenso de los testículos

Para asegurar las mejores condiciones de espermatogénesis, los testículos de la mayoría de los mamíferos deben adoptar una posición extracorpórea, lo cual causa un descenso de temperatura de entre 2 y 4°C (13). De hecho, en humanos está suficientemente probado que las temperaturas altas en los testículos provocan patologías clínicas, incluso de infertilidad, asociada a defectos en la espermatogénesis (14). Al final del segundo mes de vida intrauterina, el testículo y el mesonefros están unidos a la pared abdominal posterior por el mesenterio urogenital. Cuando tiene lugar la degeneración del mesonefros, la banda de inserción sirve como mesenterio a la gónada. Caudalmente se torna ligamentoso y se le denomina **ligamento genital caudal**. Desde el polo caudal del testículo se extiende también una condensación mesenquimática rica en matrices extracelulares, el **gubernaculum testis**. Antes de que el testículo descienda, esta banda de mesénquima termina en la región inguinal, entre los músculos abdominales oblicuos interno y externo en vías de diferenciación. Más adelante, cuando el testículo comienza a descender al anillo inguinal, se forma la porción extraabdominal del gubernaculum, que crece desde la región inguinal hacia las eminencias escrotales (15). En el momento en que el testículo pasa por el conducto inguinal, esta porción extra abdominal toma contacto con el piso escrotal (el gubernaculum también se forma en la mujer, pero en casos normales mantiene su forma rudimentaria). No están aclarados por completo los factores que controlan el descenso del testículo. No obstante, una evaginación de la porción extraabdominal del gubernaculum parece producir su migración; el aumento de la presión intraabdominal como consecuencia del crecimiento del órgano determinaría su paso por el conducto inguinal, y la regresión de la porción extraabdominal del gubernaculum completaría el movimiento de los testículos hacia el escroto. El testículo alcanza la región inguinal a las doce semanas de gestación, migra a través del conducto inguinal alrededor de las 28 semanas y alcanza el escroto a las 33 semanas.

Este proceso está mediado por hormonas como los andrógenos y el factor inhibidor de Müller u hormona antimulleriana (FIM/AMH)(16). Durante el descenso, se mantiene la irrigación sanguínea desde la aorta y los vasos espermáticos se extienden desde el nivel lumbar de nacimiento hasta el testículo en el escroto. El testículo desciende por el anillo inguinal y sobe el borde del pubis hasta llegar al pliegue escrotal en el momento del nacimiento. Es cubierto luego por la reflexión de un pliegue del proceso vaginal. La capa de peritoneo que cubre el testículo se llama hoja visceral de la túnica vaginal; el resto del saco peritoneal forma la hoja parietal de la túnica vaginal (17) (Figura 1).

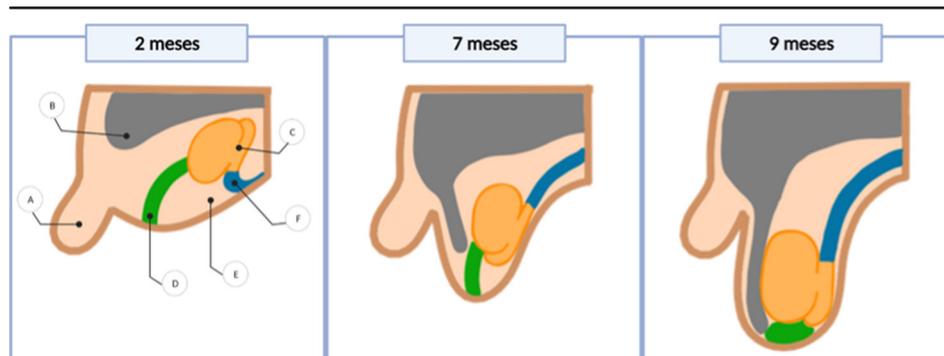


Figura 1: Descenso testicular prenatal. A: Pene; B: Cavidad peritoneal; C: Testículo; D: Gubernaculum testis; E: Canal inguinal; F: Conducto deferente.

1.1.2. Anatomía testicular

Los testículos son los órganos productores de las células germinales masculinas, los espermatozoides. Poseen además una función endocrina necesaria para mantener la espermatogénesis y otros procesos de la actividad sexual y metabólica.

En número de dos y situados en la bolsa escrotal, tienen forma ovoidea con el eje mayor vertical y su polo superior algo dirigido hacia delante. Sus dimensiones promedio son 4-5 cm de longitud, 2-4 cm de anchura y 3 cm anteroposterior y un peso que oscila entre 10,5 y 20 g (18,19).

La envoltura externa del testículo llamada **túnica albugínea** tiene una gran resistencia. En la zona posterior el tejido conjuntivo se condensa y se invagina hacia el interior del testículo formando el **mediastino testicular o cuerpo de Highmore** (18).

Desde el mediastino y de forma radial, parten unos finos tabiques fibrosos o **septos interlobulillares** que contactan con la túnica albugínea en su extremo distal. Esta disposición de tabiques divide el parénquima testicular en unos 200 a 300 compartimentos piramidales que reciben el nombre de **lobulillos testiculares**.

Cada lobulillo contiene en su interior de uno a cuatro **túbulos seminíferos** que miden entre 150 y 200 µm de diámetro y unos 30 a 70 cm de longitud. Su disposición es de plegamiento dentro del lobulillo. Constituyen la parte exocrina del testículo, conteniendo células de soporte y células germinales. El segmento final de cada túbulo seminífero, situado en el vértice de los lobulillos, se hace menos tortuosos y va formando los **tubos rectos** que son ya la primera parte de la vía excretora (20).

Los tubos rectos se reúnen en la zona septal de la **rete testis**, estructura tubular revestida de epitelio. Esta misma rete testis tiene otras dos porciones, la **mediastínica** donde pueden desembocar tanto los tubos rectos como directamente algunos túbulos seminíferos y la porción **extratesticular**, en su extremo opuesto, donde la estructura tubular forma de 8 a 15 conductos o **conos eferentes** que se anastomosan entre sí para dar lugar al conducto epididimario (21) (Figura 2).

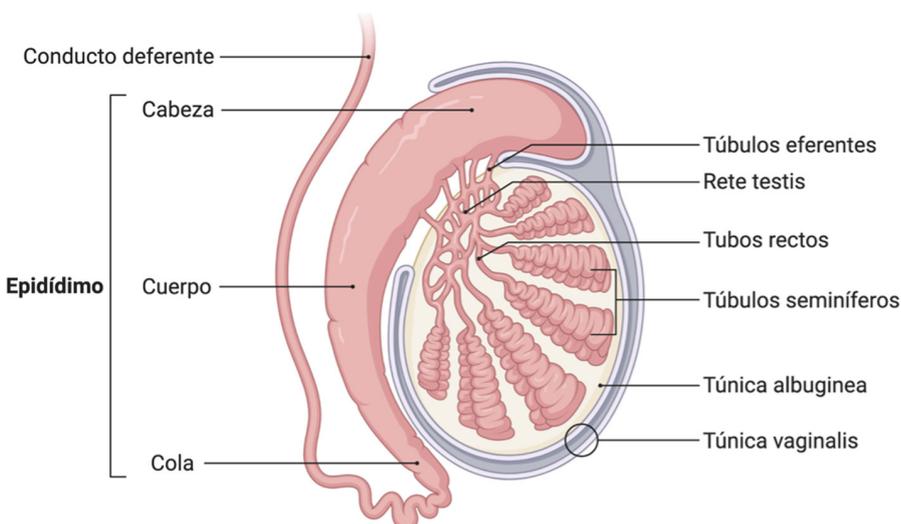


Figura 2: Anatomía del testículo.

En el seno del tejido conjuntivo de la cara interna de la túnica albugínea y de los espacios peritubulares hay vasos arteriales, venosos y linfáticos, así como un grupo de células que constituyen el tejido endocrino del testículo, **las células de Leydig**, que tienen como función la producción de testosterona (22).

La **vascularización** del testículo se hace principalmente por la *arteria espermática* o *testicular*, rama de la aorta y se ve complementada por la *arteria funicular*, rama de la epigástrica y la *arteria deferencial*, rama de la vesical. Las venas procedentes del testículo se agrupan formando un denso conglomerado llamado *plexo pampiniforme* que desemboca en la vena gonadal o espermática. Esta vena en su lado derecho desemboca en la vena cava inferior, mientras que en el lado izquierdo lo hace en la vena renal ipsilateral. El trayecto más largo y con una desembocadura en ángulo recto de esa vena gonadal, parece favorecer la presencia de los varicoceles fisiológicos o no sobre el teste izquierdo.

El **drenaje linfático** se realiza hacia los ganglios latero-aórticos desde la bifurcación aórtica hasta el pedículo renal.

La **inervación** testicular tiene dos orígenes el *plexo espermático*, acompaña a la arteria del mismo nombre y se dirige al testículo y parte del epidídimo y el *plexo deferencial* que acompaña a su arteria homónima y que solo inerva el epidídimo (18,19).

1.1.3. Fisiología espermática

1.1.3.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el que las células germinales indiferenciadas diploides situadas sobre la basal de los túbulos seminíferos, y que reciben el nombre de espermatogonias, van a transformarse en células haploides denominadas espermatozoides.

Se puede dividir en cuatro fases (23): a) la **espermatogoniogénesis** también denominada fase proliferativa o de multiplicación. En ésta se produce una proliferación y diferenciación de las células diploides del estrato germinal. Estos procesos mantienen el número de células madre maduras y sobre otras células comienzan un proceso mitótico, en espera de su diferenciación a espermatocitos que son células tetraploides; b) la **fase de maduración**, también llamada de meiosis, que comprende la transformación de espermatocitos en células haploides a través de dos procesos de mitosis, uno reduccional o meiosis I y otro de mitosis ecuatorial o meiosis II; c) la **espermiogénesis** o fase posmeiótica en la que se diferencian las espermátides en espermatozoides maduros, y d) la **espermiación** o vertido de los espermatozoides que se encontraban adheridos a la pared del tubo seminífero a la luz del mismo (23).

Podemos encontrar casi veinte tipos celulares según el estadio de la espermatogénesis (24). Durante la fase de proliferativa diferenciamos las células madre germinales espermatogonias Ad que son las células madre de reserva con bajo índice mitótico, las espermatogonias Ad con sus cuatro subtipos de A1 a A4, también denominadas células madre renovadas, con mayor índice mitótico, al igual que las

espermatogonias intermedias y finalmente las espermatogonias B. La fase de maduración comienza con la aparición de los espermatocitos primarios diploides en cromosomas (2N) y tetraploides en ADN (4C), a continuación, se diferencian en secundarios, que ya son haploides (1N) con dos cromátidas hermanas (2C). Finalmente se diferencian en espermátidas con un número haploide de cromosomas (1N) y haploide de ADN (1C). En la fase de espermiogénesis no se produce división de celular sólo una transformación de células redondas en elongadas con desarrollo de acrosoma y flagelo. Según el estadio se las ha denominado Sa1, Sa2, Sb1, Sb2, Sc1, Sc2, Sd1 y Sd2 (25). Finalmente, el espermatozoide maduro se forma, se rompen las uniones que lo mantienen adherido a la célula de Sertoli y se expulsa a luz tubular (Figura 3).

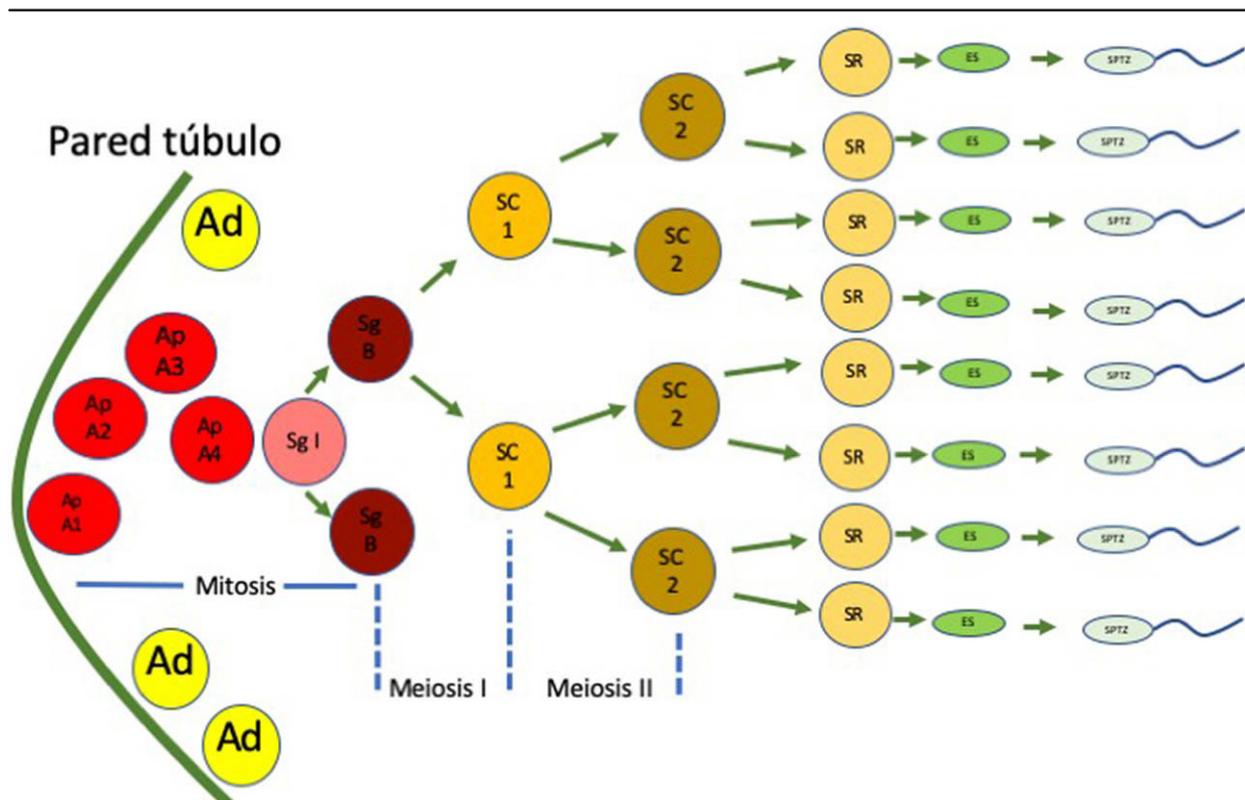


Figura 3: Anatomía Esquema de la espermatogénesis. Ad: Espermatogonias oscuras, Ap: Espermatogonias pale, Sg I: Espermatogonia intermedia, Sg B: Espermatogonia B, SC1: Espermatocitos primarios, SC2: Espermatocitos secundarios, SR: Espermátides redondas, ES: espermátides alargadas, SPTZ: Espermatozoides. En el proceso total de la espermatogénesis se liberan a la luz tubular 16 espermátides elongadas provenientes de cada espermatogonia tipo Ap a través de sucesivas divisiones mitóticas y meióticas. (Elaboración propia Carlos Balmori).

El flujo celular en la pared de los túbulos seminíferos no es sincrónico. Cada segmento de túbulo en un momento dado y de manera espiral se encuentra en una fase del proceso de la espermatogénesis. Se han descrito seis estadios atendiendo a la agrupación celular que encontramos si realizamos un corte histológico de un túbulo seminífero. El paso de estadio I a VI se produce en unos 16 días. Para la diferenciación total desde espermatogonia a espermatozoide se precisan 4,5 ciclos por lo que el tiempo total del proceso de la espermatogénesis se estima en 72-74 días para la especie humana (26).

1.1.3.2. MADURACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL EPIDÍDIMO

El espermatozoide permanece en el epidídimo entre los 2 y 11 días dependiendo de la actividad eyaculatoria del individuo (26). A pesar de que el epidídimo presenta una estructura de aspecto homogéneo y una formación tubular continua, su formación está codificada por diferentes genes que condicionan el desarrollo de zonas diferenciadas dentro del mismo (27,28).

A lo largo de la luz de los túbulos epididimarios encontramos células principales, estrechas, claras, basales, linfocitos (células halo), dendríticas en distintas proporciones y tamaños, así por ejemplo encontramos células principales, basales y claras en todo el epidídimo y estrechas sólo en la cabeza (29). Todo ello confiere diferentes funciones: en la cabeza y cuerpo se producen actividades de maduración espermática y la región de la cola es fundamentalmente un reservorio espermático (29).

Los cambios que se producen en los espermatozoides comprenden modificación de la composición de los fosfolípidos de membrana y la cantidad de colesterol en proporción a los fosfolípidos, incrementos de las uniones disulfuro y de la carga negativa de superficie, expresión de antígenos de superficie y la modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie (29). Acompañando a los espermatozoides durante su trayecto epididimario se encuentra el fluido seminal que depende de la resorción de agua por un mecanismo estrógeno dependiente y de la absorción de iones de Na^+ y de la secreción de múltiples proteínas y compuestos como L-Carnitina, mioinositol y glicerofosfocolina (GPC). Éstas últimas moléculas parece que tienen una gran importancia en la fase de almacenamiento del espermatozoide (30). Por otra parte, en el epidídimo se produce una acidificación del pH y disminución de la concentración de bicarbonato que permite el estado necesario de latencia del espermatozoide durante su estancia epididimaria (30). La capacidad de motilidad del espermatozoide se consigue por la producción intracelular de ATP y cambios intracelulares de pH, Ca^{2+} , adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y de la actividad de la proteína fosfatasa PP1g2 sin embargo, el movimiento no es funcional hasta después de la eyaculación (31,32).

1.1.3.3. CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides ascienden desde la vagina al útero a través del cuello uterino. Las concentraciones de bicarbonato aumentan a medida que los espermatozoides se acercan a las trompas de Falopio y más en el momento de la ovulación. Esto cambia el medio ácido en el que se encontraba el espermatozoide como describimos en la maduración epididimaria. La enzima adenilciclase soluble interviene en la producción de cAMP, que a su vez activa la proetinquinasa A (PKA). La membrana plasmática se desestabiliza cada vez más debido a la codificación de fosfolípidos mediada por la actividad PKA y permite la migración del colesterol a la región apical de la cabeza espermática. El proceso conocido como flujo de colesterol genera una salida de éste, modulando los niveles intracelulares de calcio y bicarbonato, además de producir la formación de unas balsas lipídicas que contendrán las proteínas necesarias para la unión a la zona pelúcida (ZP) y promover la reacción acrosómica (33). Un evento posterior de acción

de PKA en la capacitación es el aumento en la fosforilación de proteínas con residuos de tirosina, lo que lleva a una modificación de las proteínas asociadas con la fertilización. La hiperactivación es un evento dependiente de calcio, a través de unos canales específicos conocidos como CatSper, que estimulan la motilidad propulsora requerida para la unión a la ZP (34). Al entrar en contacto con la zona, los espermatozoides se someten a la reacción acrosómica, otro proceso dependiente del calcio que permite la liberación del contenido acrosómico, compuesto por enzimas hidrolíticas como la acrosina y la hialuronidasa que degradan la capa de glucoproteína de la ZP (35). Esta etapa final conduce al contacto entre el espermatozoide y el oolemma, y así se logra la fertilización (36).

1.1.3.4. REGULACIÓN NEUROENDOCRINA

El eje hipotálamo-hipofisario-testicular es el encargado de regular la función reproductora de los mamíferos, en una doble vertiente, la de asegurar la potencia sexual y la fertilidad. Constituye un complejo mecanismo de autorregulación (bio-feedback) cuyos objetivos principales son: producir el desarrollo sexual, mantener la función sexual en el adulto y regular la función espermática.

El hipotálamo, estructura cerebral integradora entre el sistema nervioso y endocrino, segrega polipéptidos que, cada uno de ellos, estimulan la producción de una sola hormona hipofisaria, excepto el polipéptido conocido como hormona liberadora de gonadotropinas, también denominado GnRH o LHRH, que induce la producción de dos hormonas en la hipófisis, las gonadotropinas FSH y LH. La producción de las gonadotropinas en la adenohipófisis responde a los pulsos de GnRH (37). Los niveles elevados y continuos de FSH y LH producirán una retroalimentación negativa sobre su liberación. La acción de las gonadotropinas se desarrolla en el testículo al que llegan por el torrente sanguíneo (38).

La secreción de LH comienza después de la pubertad, en un principio con elevaciones nocturnas más notables, que se van equilibrando a lo largo del día conforme se avanza en edad. La acción de la LH se produce a través de los receptores situados en las células de Leydig sintetizando testosterona. Por su parte la FSH también actuará en las células de Sertoli estimulando la producción de otras hormonas como la inhibina, estrógenos, activina y folistatina (39,40). La acción conjunta de testosterona y FSH promueve la espermatogénesis, entre otras acciones necesarias como son la producción de proteína fijadora de andrógenos (ABP). Los mecanismos de retroalimentación negativa permiten un autocontrol por parte de las sustancias secretadas por el testículo sobre los niveles de gonadotropinas. Así, la testosterona y en menor grado los estrógenos en el varón inhiben a dos niveles el eje gonadal, por una parte, frenando la secreción hipofisaria de gonadotropinas y por otra, disminuyendo los pulsos de GnRH en el hipotálamo. La propia espermatogénesis, a través de la inhibina, frena la producción de FSH (23) (Figura 4).

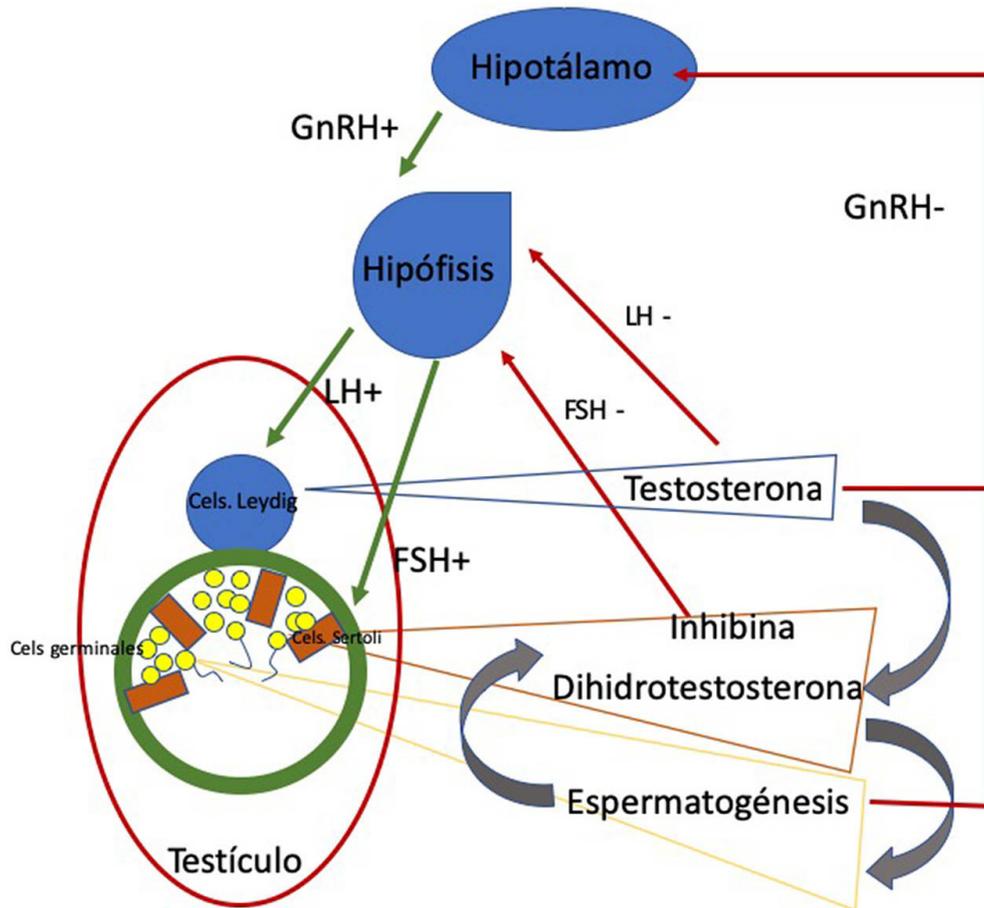


Figura 4: Eje hipotálamo-hipofisario-testicular: La secreción de GnRH por las células nerviosas hipotalámicas llegan a la adeno-hipófisis a través del sistema portal para estimular la producción de LH y FSH. La LH actúa sobre las células de Leydig testiculares activando la producción de testosterona. La FSH sobre las células de Sertoli de la pared tubular estimula la actividad nuclear necesaria para la espermatogénesis por medio de la dihidrotestosterona, metabolito activo producido por la acción de la 5 alfa reductasa sobre la testosterona. En las mismas células de Sertoli se produce la inhibina en relación directa con la concentración espermática. La inhibina frena el estímulo de la FSH hipofisaria para autorregular la producción espermática. (elaboración propia Carlos Balmori).

1.2. INFERTILIDAD

1.2.1. DEFINICIÓN DE INFERTILIDAD

Los términos infertilidad, esterilidad e infecundidad, a menudo, se usan indistintamente, sin tener en cuenta la definición precisa. Además, las definiciones de estos términos pueden diferir sustancialmente entre el uso demográfico, médico y entre los idiomas. En 2006, el Comité Internacional para la Monitorización de las Tecnologías de Reproducción Asistida (ICMART por sus siglas en inglés International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies) publicó un primer glosario de 53 términos y definiciones sobre fertilidad e infertilidad (41). En 2009, ICMART junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicaron una versión revisada ampliada a 87 términos, que definía la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo y una mayor estandarización de la terminología del tratamiento de fertilidad (42). Fue traducida a varios idiomas, entre ellos el español (43). Finalmente en 2015, ICMART en colaboración con las siguientes asociaciones: American Society for Reproductive Medicine (ASRM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), International Federation of Fertility Societies (IFFS), March of Dimes (MOD), African Fertility Society (AFS), Groupe Inter-africain d'Etude de Recherche et d'Application sur la Fertilité (GIERAF), Asian Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE), Middle East Fertility Society (MEFS), Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (REDLARA) y la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), realizan una revisión de la terminología, consensuando 283 términos (44).

La definición de infertilidad según el este glosario de términos y admitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la siguiente: "Una enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección o debido a un deterioro de la capacidad de una persona para reproducirse como individuo o con su pareja. Las intervenciones de fertilidad pueden iniciarse en menos de 1 año según los antecedentes médicos, sexuales y reproductivos, la edad, los hallazgos físicos y las pruebas de diagnóstico. La infertilidad es una enfermedad, que genera discapacidad como un deterioro de la función" (44).

1.2.2. INFERTILIDAD MASCULINA

1.2.2.1 Concepto

Realmente no hay una definición de lo que se considera infertilidad masculina.

Hoy en día se considera que un varón es infértil si el estudio de la pareja es rigurosamente normal y la calidad del seminograma no se ajusta a lo que estadísticamente se considera como normal según la OMS (45). No obstante, se están buscando otros parámetros, como puede ser la fragmentación del DNA de espermatozoides, que puedan explicar cómo el factor masculino está causando infertilidad (46) (Tabla1).

Tabla 1. Criterios de interpretación del seminograma según WHO y la denominación de los hallazgos patológicos.

PARÁMETRO	VALORES	DENOMINACIÓN	
Concentración (M/ml)	≥20 ≥15****	Normal	Normozoospermia
		Alto	Polizoospermia
		Bajo	Oligozoospermia
		Ausencia	Azoospermia
		Ausencia en fresco y presencia en sedimento	Criptozoospermia
Recuento total (M/eyaculado)	≥40 ≥39	Bajo	Oligozoospermia
Motilidad A+B (%) PR (%) PR+NP (%)	≥50 ≥32**** ≥40****	Baja	Astenozoospermia
Morfología (% normales)	≥50* ≥30** ≥14*** ≥4*****	Baja	Teratozoospermia
Aglutinación (%)	≤10		
Leucocitos(M/ml)	<1	Elevado	Leucos, Leucocito o Piospermia

(* OMS 1987; ** OMS 1992, *** Kruger (Tygerberg) Criterios estrictos OMS 1999, **** OMS 2010)

1.2.2.2. Prevalencia

La infertilidad afecta a casi una de cada cinco parejas en edad reproductiva, supone entre un 8 y 12% de éstas (47). En 2002 más de 186 millones de mujeres en edad reproductiva (de 15 a 49 años) en los países en desarrollo (excluyendo China) presentaba infertilidad primaria o secundaria (48). En España se hacía una estimación para el año 2020 de una probabilidad de problemas de infertilidad entre un 18 y 25% de las parejas en edad fértil, lo que supone 18.500 nuevos casos/año (49). No hay datos oficiales publicados sobre cual ha sido realmente el porcentaje, pero encuestas en diversos centros de reproducción estiman que en 2020 ha sido de 1 de cada 4 parejas.

Sharlip (2002), estimó que la infertilidad masculina, como única causa de los problemas de fertilidad de una pareja, está entorno al 20-30% (50). Entre un 20-70% de las parejas infértiles tienen un factor combinado como causa (51). Sin embargo, la estimación corregida según la distribución geográfica varía entre el 2,5-12%. Las tasas de infertilidad son más altas en África y Europa central y oriental. Además,

según una variedad de fuentes, las tasas de infertilidad masculina en América del Norte, Australia y Europa central y oriental variaron entre 4'5- 6%, 9% y 8-12%, respectivamente (51).

El estudio de la prevalencia de la infertilidad masculina está, probablemente, subestimado. Ello puede ser debido a que los estudios se hacen generalmente sobre varones de parejas que acuden a una clínica de reproducción. Dependiendo de las características demográficas, económicas e incluso de la disponibilidad de un especialista en fertilidad masculina, los hombres estarán en condiciones de realizarse, o no, un estudio de su capacidad fértil lo que conllevará un gran número de varones no diagnosticados (52).

1.2.2.3. Etiología

Sigue siendo muy complicado obtener datos sobre infertilidad masculina ya que no existen unas bases de datos que reúnan el consenso de toda la comunidad científica. Tampoco son tan extensas las publicaciones sobre el factor masculino en fertilidad comparado con el femenino (53). Por eso, la única referencia cuantitativa sobre las etiologías de la infertilidad masculina, la encontramos en las Guías de la Asociación Europea de Urología (54).

Las causas de infertilidad masculina conocida, como son los casos de hipogonadismos primarios, alteraciones genéticas (XXY, XX), cirugías hipofisarias o testiculares, etc se sitúan en un 27,4%. Las de origen probable como las debidas a varicocele, criptorquidia, anticuerpos antiespermatozoides suponen el 42,6%. Por último, las idiopáticas o de causa desconocida se estiman en un 30% (54).

En estas **infertilidades idiopáticas**, los estudios básicos del varón infértil, como la historia clínica, la exploración física o el seminograma no son suficientes para llegar a un diagnóstico etiológico del problema (55). Con el fin de encontrar los orígenes de este tipo de infertilidades se han abierto múltiples campos de investigación en lo que se han denominado "**ómicas**". La genómica, epigenómica, transcryptómica y proteómica de la espermatogénesis puede aportar datos susceptibles de ser usados para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la infertilidad masculina (56). Otras causas de infertilidad pueden estar basadas en los trastornos moleculares como la longitud telomérica.

1.2.3. EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Hasta los últimos años, la mayoría de los tratamientos de infertilidad por un factor masculino, establecidos en las clínicas de fertilidad no van encaminados a lograr una mejoría sustancial de la calidad seminal que permitiera la fecundación de una forma natural, sino a establecer cuál de las tres técnicas básicas de la reproducción asistida, que son la inseminación, la fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática (ICSI), es la más adecuada para el defecto de la calidad seminal (57). En el caso de que exista una disminución de la movilidad y una concentración espermática de entre 0,8 a 5×10^6 , si fallan entre 3 a 6 intentos de una inseminación artificial, se puede intentar una FIV. Si la concentración, motilidad o calidad espermática es extremadamente deficiente, se hace necesario utilizar un ICSI (58).

La necesidad de seguir mejorando los resultados de las técnicas de reproducción asistida ha llevado a un estudio más exhaustivo del factor masculino. Múltiples estudios están relacionando la fertilidad masculina con enfermedades autoinmunes, oncológicas, cardiovasculares y otras patologías crónicas. No se conocen con certeza los mecanismos fisiopatológicos comunes a estas patologías y la fertilidad, pero se barajan factores genéticos, de desarrollo y de estilos de vida (59).

Se postulan una batería de abordajes para tratar los problemas de la infertilidad masculina como son los cambios en el estilo de vida, el tratamiento quirúrgico del varicocele, el uso de antioxidantes, la corrección o modificación de medicaciones que tome el paciente y que puedan interferir en la calidad seminal o la recuperación espermática mediante biopsia testicular (TESE) o micro biopsia testicular (MicroTESE) (60).

1.2.4. PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD

En los casos en que la viabilidad futura de los espermatozoides de un varón esté en riesgo debido al padecimiento de una enfermedad o los tratamientos a los que deba someterse, es necesario utilizar procedimientos que nos permitan conservar la capacidad reproductiva. El ejemplo más claro lo tenemos en los pacientes que sufren cáncer testicular en los que la extirpación del propio órgano puede mermar sus posibilidades genésicas e incluso todavía pueden verse más mermadas por la utilización de quimio o radioterapia.

A continuación, se enumeran las distintas posibilidades que hoy en día se utilizan, tan sólo la criopreservación espermática es una posibilidad real y efectiva, siendo el resto objeto de estudio y controversia:

Criopreservación espermática: Es la técnica más sencilla y ampliamente utilizada en paciente adolescentes y adultos. Sólo un 24% de los pacientes tiene semen criopreservado antes de su tratamiento oncológico, bien por no haber sido informado o por ausencia de espermatozoides en el eyaculado. En algunos de los pacientes azoospermicos la realización de una biopsia testicular permite obtener espermatozoides para la criopreservación (61).

Un caso particular es el de la recuperación espermática mediante biopsia de un testículo afectado por tumor. Se denomina *OncoTESE (Oncological testicular Sperm Extraction)* y consiste en realizar una búsqueda de espermatozoides en el tejido que circunda al tumor, bien en casos de tumorectomía o en casos de orquiectomía total (62).

Criopreservación de tejido testicular humano: Debido a que los niños prepúberes no pueden generar esperma, un enfoque alternativo potencial para preservar su fertilidad implica la criopreservación de su tejido testicular. Este enfoque también es apropiado para pacientes adolescentes y adultos que ya son azoospermicos en el momento del diagnóstico de cáncer o después de la quimio o radioterapia. Las células testiculares se pueden criopreservar como suspensión celular o en forma de tejido. El método óptimo de almacenamiento aún no está claro (63). Sin embargo, la criopreservación de tejido testicular brinda la opción futura de usarlo tanto para tejido (como injerto testicular o cultivo de órganos)

como para terapia celular (como trasplante de células germinales y maduración in vitro), mientras que la criopreservación de suspensión de células testiculares puede ser utilizado en el futuro solo para terapia celular. Además, la criopreservación del tejido testicular mantendrá el nicho de microambiente de las células madre de las espermatogonias (SSC), principalmente las células somáticas, Sertoli, Leydig y las células peritubulares, lo que puede aumentar la viabilidad y funcionalidad de las SSC después de la descongelación del tejido en comparación con las células criopreservadas descongeladas (64).

Trasplante de células germinales: Esta tecnología fue desarrollada por Brinster y sus colaboradores en 1994. Incluye la inyección (trasplante) de células germinales testiculares aisladas de ratones transgénicos lacZ en los túbulos seminíferos de ratones infértiles. Después de unos meses, se desarrolló la espermatogénesis y los ratones se volvieron fértiles (65). La principal limitación de esta tecnología en humanos es la posible contaminación de las células testiculares con células cancerosas que pueden reintroducir la malignidad en el paciente después de la recuperación. Hoy en día, no existe un método preciso y seguro que aisle SSC puros de los testículos de los pacientes, además de la muy pequeña cantidad de biopsia testicular que podría usarse, contiene un número muy pequeño de estas células (66).

Autoinjerto ó xenoinjerto de tejido testicular: El uso de tejido testicular para inducir a las espermatogonias del donante a completar la espermatogénesis in vivo o in vitro (cultivo de órganos) se basa en la disponibilidad de las células somáticas para permitir el desarrollo adecuado de la SSC. El xenoinjerto de tejido testicular se realizó con éxito en ratones inmunodeficientes utilizando tejido testicular de diferentes especies, que se injertó debajo de la piel, produciendo una espermatogénesis completa (67). Cabe señalar que los xenoinjertos testiculares en ratones pueden conducir a la transmisión de virus a la línea germinal humana. Además, los autoinjertos testiculares en pacientes humanos con cáncer tienen la limitación de producir, posiblemente, un resemblance de células malignas, promoviendo la recurrencia del cáncer. Sin embargo, esta tecnología podría considerarse en pacientes sin cáncer (68).

Xenoinjerto de células testiculares: En comparación con el xenoinjerto de tejido testicular, esta técnica puede permitir una mayor exposición de las células testiculares al nuevo entorno. El xenotrasplante de células testiculares (una combinación de células somáticas y germinales en diferentes porcentajes) de lechones (debajo de la piel de ratones desnudos) condujo al desarrollo de espermatogénesis completa (después de 30 semanas), incluida la generación de espermatozoides (en el 10% de los túbulos seminíferos formados) (69).

Cultivo de órganos: El desarrollo de la espermatogénesis utilizando cultivo de órganos para pasar a las etapas meióticas se realizó en el pasado sin éxito. Sin embargo, Sato y colaboradores, en 2011, logró inducir el desarrollo de espermatozoides fértiles utilizando un cultivo in vitro de pequeños fragmentos (alrededor de 3 mm) de tejido testicular de ratones inmaduros (70). La aplicación exitosa de este sistema utilizando tejido testicular humano podría evitar el autotrasplante testicular para generar espermatozoides y la posibilidad de reintroducir células cancerosas en pacientes curados. Sin embargo, no hay información del uso de esta técnica en humanos.

Cultivo in vitro de SSC: Varias técnicas se han descrito: Sistemas de cultivo bi y tridimensionales, estructuras de bioimpresoras en 3D, "organoides" testiculares, sistema de microfluidos y tecnología Organ-on-Chip (68).

Inducción de células madre pluripotentes: El desarrollo de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células somáticas es posible mediante su transfección con una combinación de factores de transcripción (71). Uno de los enfoques para la preservación de la fertilidad masculina incluye el desarrollo de iPSC generadas a partir de células somáticas, como fibroblastos dérmicos, células sanguíneas o queratinocitos, desde pacientes infértiles hasta células germinales primordiales (PGC) (72).

1.3. TELÓMEROS

1.3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Hacia finales de los años 30 y principios de los 40, Herman Muller que trabajaba con la mosca (*Drosophila melanogaster*) y Bárbara McClintock con el maíz (*Zea mays*) llegaron a la misma conclusión: existían unas estructuras en los extremos de los cromosomas que les conferían estabilidad, impedían la fusión entre sí, y ayudaban a la célula a distinguir entre las rupturas de doble cadena de DNA, que necesitan ser fusionadas para mantener la estabilidad genómica y los extremos de los cromosomas, que no deben unirse a nada (73). Dichas estructuras recibieron el nombre de **telómeros**, cuyo origen etimológico proviene del griego "telos" final y "meros" parte.

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas localizadas en los extremos de los cromosomas. Su primera secuencia fue descrita en Tetrahymena por Blackburn y Gall en 1978. La secuencia de los telómeros humanos, descrita por Moyzis (1988) consiste en repeticiones de ADN ricos en bases de Guanina(G) aunque también combinadas con otras bases nitrogenadas, Tiamina (T) y Adenina (A) de la siguiente forma TTAGGG y una longitud de entre 5 y 15 Kb (74).

El extremo final del telómero es una cadena de ADN simple rica en G, denominada Cola-G (G tail) que con una longitud de 75-500 bp es capaz de invadir la zona de doble cadena de ADN formando un lazo el lazo D (del inglés "displacement loop", que genera un lazo más grande llamado el lazo T (telomere loop) (75). El ADN telomérico está protegido gracias a la unión de un complejo de proteínas de seis unidades llamado **Shelterina**. De las seis subunidades proteicas, tres se unen directamente al ADN, TRF1 y TRF2, se unen a la hebra doble, y POT1 se une a la hebra de cadena sencilla, TIN2 y TPP1 están interconectando las proteínas que se unen al ADN y Rap1 está unida a TRF2 (76) (Figura 5).

Los telómeros, a su vez tienen un efecto estabilizador del genoma ante agresiones genéticas. Influyen en los procesos de reparación de ADN que son esenciales para la integridad genómica (77).

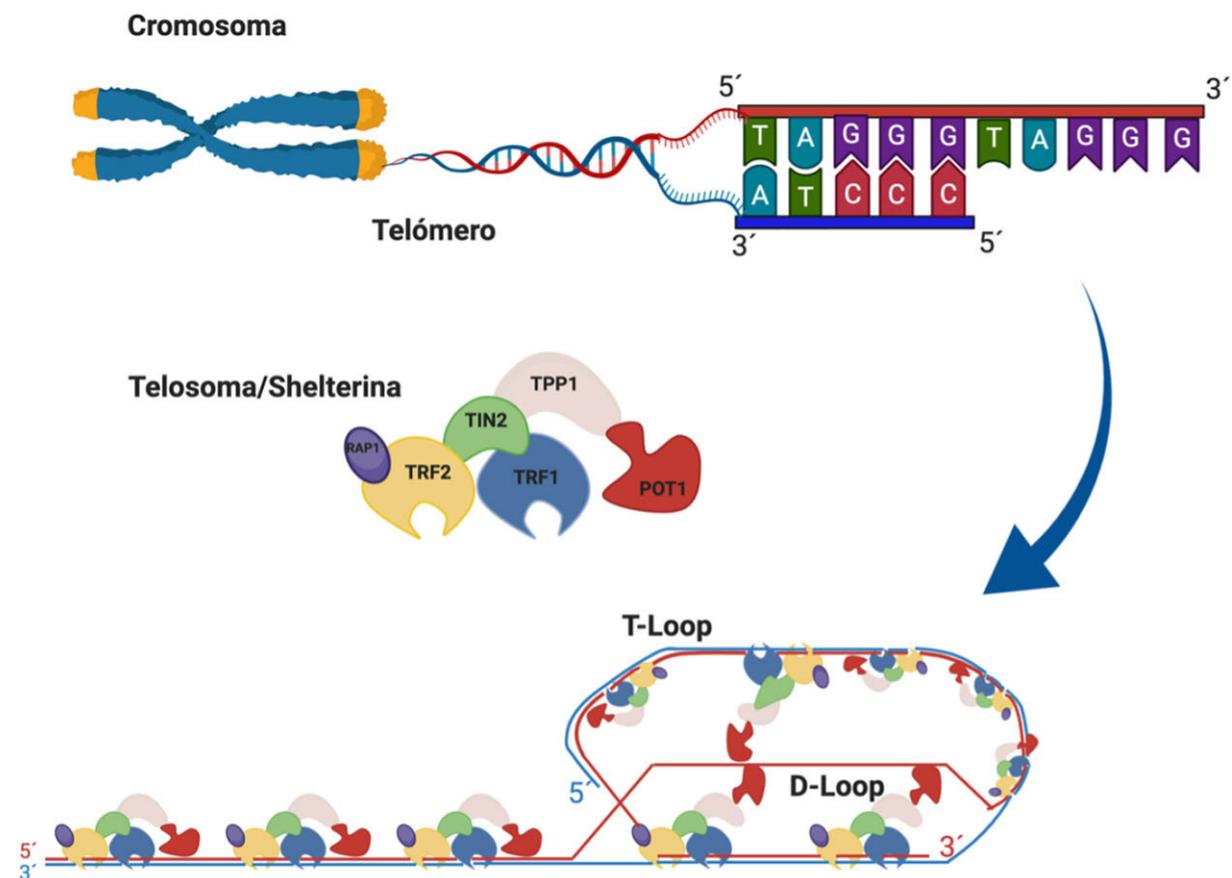


Figura 5: Esquema de telómero y su complejo protector, shelterina (Elaboración propia Carlos Balmori)

1.3.2. SHELTERINA

La shelterina "esconde" los telómeros de la maquinaria celular de reparación del daño al ADN (DDR) y de las rutas de reparación de las rupturas de doble cadena del ADN. Los mecanismos por los que la shelterina bloquea estas vías siguen en estudio, aunque se empiezan a conocer algunos de estos mecanismos. Lo conocido hasta ahora es que, la shelterina:

- Evita la activación de tres enzimas de respuesta al daño de ADN: la quinasa ataxia telangiectasia-mutada (ATM), la quinasa ataxia telangiectasia relacionada con Rad3 (ATR) y la poliADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1).
- Bloquea las tres vías de reparación de daño de doble cadena: la recombinación homólogos clásica (c-NHEJ), la recombinación no homólogos alternativa (alt)-NHEJ y reparación dirigida por homología (HDR).
- Previene la hiperresección de los telómeros.

Se ha avanzado en el conocimiento del papel que juega la shelterina en el mantenimiento del extremo 3' de cadena sencilla, sobre la forma y protección del lazo T, que es importante para la integridad de los cromosomas y sobre la replicación segura a través de los telómeros, evitando que se formen fragmentos de ADN frágiles que son propensos a romperse. Cada subunidad individual de la shelterina se

dedica a funciones específicas de protección del extremo final (78).

Entre las shelterinas, cabe destacar que TRF1 (telomeric Repeat Binding Factor 1) que es de 50.2 KDa en humanos (79) y se une de manera específica a la hebra de ADN de doble cadena formando un homodímero (80). TRF1 está implicado en la protección telomérica para que no haya fusiones entre cromosomas (81) y en facilitar la replicación de los telómeros, ya que cuando TRF1 se elimina en las células, la horquilla de replicación de los telómeros permanece bloqueada (81) y se generan sitios frágiles en la cromatina (82). Desde el punto de vista del organismo, TRF1 es esencial para la formación del organismo. De hecho, la delección de este gen conduce a la apoptosis en el estadio de blastocisto (83). La delección condicional del gen que codifica TRF1 en tejidos epiteliales demuestra su implicación en la regeneración de los tejidos (82) y en la función de las células madre adultas (84). Los niveles de la proteína TRF1 decrecen con la edad, la terapia génica con TRF1 en ratones mejoraba su manera de envejecer (85). Hay que tener en cuenta que debido a distintos polimorfismos del gen para TRF1 estos se pueden asociar o no a telómeros más cortos (86).

1.3.3. LÍMITE DE HAYFLICK

La división celular es el mecanismo por el que los seres pluricelulares crecen desarrollando y manteniendo sus tejidos. Sin embargo, el denominado límite de Hayflick determina que esas divisiones son limitadas y eso conlleva la muerte celular (87). El denominado "*problema de la replicación de los extremos de ADN*" descrito por Olovnikov explica el fenómeno del límite de Hayflick, ya que los cromosomas lineales de los organismos eucariotes son incapaces de replicar sus extremos (88). Esto va a provocar un acortamiento progresivo de las cadenas de ADN teloméricas en cada división celular. Por tanto, la edad y otros factores como la acción de las nucleasas o la de la exposición a especies libres de oxígeno (ROS) producirán un acortamiento de los telómeros, que, por debajo de una longitud crítica, elimina la capacidad protectora de los telómeros, produciéndose fusiones entre los extremos de los cromosomas, la detención del ciclo celular, desestabilización celular y finalmente, deterioro de los tejidos y apoptosis celular (89).

1.3.4. TELOMERASA. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El problema de la replicación terminal se resuelve con la enzima telomerasa. La telomerasa es una ADN polimerasa dependiente del ARN, es decir, puede producir ADN usando ARN como molde (90,91). La telomerasa se compone de una subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa (Tert), un componente de ARN (Terc) que actúa como molde para la síntesis de ADN y varias proteínas accesorias, entre ellas la proteína disquerina (Dkc1), que se une y estabiliza el Terc (92). La telomerasa se activa durante la embriogénesis, en la transición de mórula a blastocisto (93), encontrándose los telómeros más largos en la masa celular interna del blastocisto (94,95). En este punto se establece la longitud telomérica de cada individuo (93). La mayoría de las células del cuerpo tienen silenciada la actividad telomerasa (96). En los tejidos adultos humanos de alto potencial regenerativo como la médula ósea, la piel y el tracto

intestinal, igual forma que los linfocitos activados (97,98) se sigue expresando actividad telomerasa en las células madre adultas. Esta actividad telomerasa es suficiente como para mantener los telómeros de las células madre más largos que los de las células somáticas, pero aun así, los telómeros de las células madre adultas también se acortan con el tiempo (99). Esto que en principio podría parecer una desventaja para el organismo, es una protección frente al cáncer (100), dado que más del 85% de las células tumorales reactivan la telomerasa. Además de las células cancerosas, las células madre embrionarias y las células de la línea germinal tienen actividad telomerasa (100–102).

1.4. DISFUNCIÓN DE LOS TELÓMEROS

1.4.1. TELÓMEROS ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDAD

Con la edad se produce un acortamiento en la longitud telomérica (LT), que se puede detectar en diversas células somáticas, por eso la longitud telomérica es considerada como un buen biomarcador de edad (100). De hecho, el acortamiento telomérico con la edad está relacionado con enfermedades asociadas al envejecimiento como arteriosclerosis, hipertensión, diabetes, enfermedad de Parkinson o de Alzheimer (103). La longitud telomérica y la tasa de acortamiento telomérico está genéticamente establecida genéticamente en cada especie. En humanos los telómeros se acortan a un ritmo de 70 pares de bases al año (104). Hay mucha variabilidad entre individuos. Las personas que tienen una longitud telomérica inferior a la media tienen más posibilidades de sufrir enfermedades asociadas al envejecimiento. De hecho, cuando hay mutaciones en genes relacionados con la telomerasa aparece un acortamiento acelerado de los telómeros, con dificultades para mantener la homeostasis de los tejidos y esto da lugar a enfermedades severas como la disqueratosis congénita, la anemia aplásica y fibrosis pulmonar (105,106).

Sin embargo, en otro tipo de enfermedades como el cáncer se produce un fenómeno diferente, la telomerasa se activa manteniendo una mínima longitud telomérica que permite a las células dividirse indefinidamente, por tanto, se produce la inmortalización de las células (100). Algunas células tumorales alargan sus telómeros sin activar la telomerasa, mediante la vía ALT (alargamiento alternativo de los telómeros) que implica recombinación o intercambio de cromátidas hermanas (107). Las rutas implicadas en la regulación y el mantenimiento de los telómeros son críticas para prevenir enfermedades, incluyendo el cáncer y para evitar el deterioro celular (108,109). Este mantenimiento telomérico es más efectivo en las células que expresan telomerasa, como en las células germinales (110,111). La búsqueda de inhibidores de la telomerasa o de inhibidores de las shelterinas para evitar el desarrollo tumoral, pero que a la vez no produzcan un deterioro de las células sanas, será uno de los grandes avances contra el cáncer (100).

También se han relacionado altos niveles de estrés psicosocial con un acortamiento de los telómeros y trastornos inmunológicos. como el estudio llevado a cabo por Demajanovic y colaboradores (2007) sobre familiares que cuidan durante largo tiempo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (112).

La depresión y el dolor pueden ser otros factores determinantes del acortamiento telomérico (113,114).

Por otra parte, es posible reducir la erosión de los telómeros con el ejercicio físico y esto tiene efectos beneficiosos retrasando ciertos síntomas del envejecimiento, como es la densidad mineral ósea (115).

Otro factor protector sobre la integridad de los telómeros es la dieta mediterránea (116).

1.4.2. TELÓMEROS E INFERTILIDAD MASCULINA

1.4.2.1. TELÓMEROS Y ESPERMATOZOIDES

Las células de las series germinales, entre ellas los espermatozoides, presentan unos telómeros más largos (10 a 20Kb) (117) y no parecen sufrir el acortamiento que tiene lugar en las células somáticas con la edad (118). Las células madre germinales presentan actividad telomerasa, pero al dividirse y diferenciarse, se pierde la actividad telomerasa, de modo que los espermatozoides ya no presentan dicha actividad (110,111). Esta actividad podría ser mayor en los testículos de hombres con más edad y explicaría por qué los telómeros son más largos que los de individuos jóvenes, lo cual descartaría que hubiera una modificación en la regulación de la longitud telomérica durante la espermatogénesis (119). Hay autores que niegan ese teórico "rejuvenecimiento" de los testículos del hombre de más edad y además muestran que el alargamiento telomérico en esperma de dichos varones se debe a la vía ALT, en lugar de a un aumento de telomerasa (120). Otros abogan por una erosión transgeneracional progresiva de los telómeros en las series germinales que podría incluso producirse por una influencia de la serie germinal femenina (121–123). Lo cierto es que aún hacen falta más estudios para entender el porqué de este alargamiento telomérico de los espermatozoides con la edad y sus consecuencias para la descendencia, que también suscitan mucha controversia entre los investigadores.

1.4.2.2. LONGITUD TELOMÉRICA Y HERENCIA

Teniendo en cuenta que la descendencia recibe la mitad de su carga cromosómica del espermatozoide, parecería lógico pensar que la longitud de los telómeros paternos tendría influencia en la LT de las células del nuevo individuo. Esta hipótesis se ha visto en numerosos estudios donde se observa que la longitud mayor de los telómeros de los espermatozoides de padres de más edad repercute en que la descendencia posea células con mayor LT (124,125). Sin embargo, no parece que la LT materna tenga influencia en la LT de la descendencia (126) dado que los ovocitos permanecen estancados en meiosis durante décadas, y expuestos a diversos factores que acortan los telómeros, como las especies reactivas de oxígeno (127). La edad paterna de la concepción (EPC) tiene por tanto una importancia fundamental en la LT de su descendencia, siendo más evidente en algunas especies animales como los primates, aunque también podría influir la mayor tasa de producción espermática (128,129). Comparando la LT de los ovocitos y espermatozoides progenitores con los cigotos y embriones de dos células generados, se evidencia una dependencia clara de los espermatozoides, independientemente de los niveles de telomerasa (130). La mayoría de los estudios confirman que, si existe una relación positiva entre LT y sexo

femenino, los telómeros son más largos en promedio que el de los hombres, sin embargo, se barajan teorías como la exposición a estrógenos o una menor exposición a los radicales libres como explicación a este hecho (131).

1.4.2.1. IMPLICACIONES SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA

Se han realizado numerosos estudios sobre las relaciones entre los telómeros y la fertilidad masculina. Así, el efecto estabilizador del genoma se puede ver afectado por diversos agentes genotóxicos como pueden ser los quimioterápicos, éstos reducen la LT de las líneas de células germinales masculinas que posteriormente se traduciría en alteraciones testiculares y de los parámetros del seminograma incluyendo integridad del ADN espermático y problemas con la descendencia (132). En poblaciones de pacientes infértiles se encuentran espermatozoides con LT más corta que en los fértiles, pero dicho acortamiento no se correlaciona ni con la concentración, movilidad o morfología espermática ni con los índices de fragmentación de DNA de los espermatozoides (IFD) (133). El acortamiento de los telómeros en los pacientes infértiles sí tiene relación con el ARN que contiene repeticiones teloméricas (TERRA) y con los niveles, medidos a través de la subunidad catalítica transcriptasa inversa (TERT), de la telomerasa, aunque las relaciones entre TERRA y TERT no varían (134). Estos datos y otros parecen indicar que tanto la LT como los niveles de telomerasa pueden ser unos biomarcadores sobre la fertilidad masculina, estando relacionados con la concentración y movilidad espermática, así como con los IFD (135–137).

La calidad de los embriones y embriones transferibles tienen una relación con la LT de los espermatozoides (LTE), pero las tasas de embarazo no se ven afectadas (138). El deterioro de la capacidad reproductiva del hombre de edad avanzada viene de terminado por múltiples factores como son el declive hormonal, el estrés oxidativo, las enfermedades inflamatorias e inmunitarias, las disfunciones sexuales, la inestabilidad del genoma, las alteraciones dietéticas, del estilo de vida y el acortamiento de los telómeros (139).

Hemos visto que una presencia de LTE mayor puede tener efectos beneficiosos en la fertilidad, por tanto, la utilización de espermatozoides con una LT mayor en una técnica de reproducción asistida (TRA) podría ser una manera de solventar algunos casos de infertilidad. Las técnicas de swim up y de gradiente de densidad obtienen espermatozoides con mayor LT y menor IFD sin diferencias significativas entre ambas lo que teóricamente permitiría seleccionar espermatozoides de mejor calidad para una TRA (140).

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO



Desafortunadamente, nos encontramos con casi un tercio de las infertilidades de origen masculino sin origen conocido. Es necesario, por tanto, realizar estudios en este campo de manera que nos permitan llegar a conocer la etiología de la infertilidad y así valorar sus posibilidades de resolución o la capacidad reproductiva de ese individuo.

Actualmente se están realizando estudios dentro de los campos de la genómica, proteómica, metabolómica y transcriptómica con el fin de delimitar qué varones pueden o no tener problemas de fertilidad, incluso con seminogramas aparentemente en rangos de normalidad.

En estos estudios, se hace referencia a unas estructuras de los cromosomas eucarióticos denominadas telómeros, cuya longitud se ha relacionado con el envejecimiento celular.

En las células somáticas existe un acortamiento de la longitud de los telómeros (LT) a lo largo de la vida del individuo, sin embargo, en las células germinales masculinas, los espermatozoides alargan la LT con la edad. No existen estudios que determinen si existen relaciones entre ambas longitudes y si en los casos de infertilidad los parámetros teloméricos están alterados.

Poder determinar con un marcador biológico, en este caso, cualquiera de los múltiples elementos del complejo telomérico como longitud de telómeros, componentes del complejo de shelterinas, telomerasa, etc., el potencial reproductivo de un individuo, podría ser un método sencillo que lleve a tomar decisiones razonadas a la hora de aplicar tratamientos dentro de las técnicas de reproducción asistida o incluso desaconsejar la utilización de los propios gametos de ese progenitor.

El objetivo principal del proyecto es estudiar la implicación de la ruta telomérica en la infertilidad masculina para encontrar biomarcadores no invasivos de infertilidad. Para ello se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un análisis de la LT en sangre y espermatozoides en varones que presenten normozoospermia (N) y los que muestren un seminograma con oligoastenozoospermia (OAZ).
2. Evaluar la acumulación de Telómeros Cortos (TC) en los grupos citados anteriormente.
3. Realizar un estudio de la protección de los telómeros en los grupos citados anteriormente, analizando la cantidad de Shelterinas presentes en las muestras de estas personas.
4. Estudiar los parámetros de fertilidad de las parejas mayores de 40 años que participen en ovodonación, para evitar el factor femenino y poder analizar únicamente el factor masculino.
5. Estudiar la correlación entre la longitud telomérica de la sangre y del espermatozoides y los parámetros de fertilidad para entender cómo afecta el factor masculino en la fertilidad y el desarrollo embrionario temprano.



MATERIAL Y MÉTODOS



Diseño y Población:

Estudio prospectivo de casos-control. Para realizarlo se seleccionaron varones de dos grupos de edades, por un lado, menores o iguales a 25 años y, por otro lado, mayores o iguales a 40 años. En estos grupos de edad se puede estudiar el efecto de la edad en los parámetros teloméricos y cómo éstos influyen en la fertilidad. Se tomó como controles a las personas jóvenes normozoospermicas.

Criterios de inclusión/exclusión:

Criterios de inclusión:

Varones de edad menor o igual a 25 años que acudan a IVI Madrid bien como donantes de semen o en el contexto del estudio por infertilidad de una pareja y que presenten seminogramas con normozoospermia, oligozoospermia u oligostenozoospermia.

Varones de edad mayor o igual a 40 años que acudan a IVI Madrid o bien para conservación de semen previo a una vasectomía o en el contexto del estudio por infertilidad de una pareja y que presenten seminogramas con normozoospermia, oligozoospermia u oligostenozoospermia.

Criterios de exclusión:

Varones que hubieran sufrido cualquier enfermedad aguda en los tres meses anteriores a su inclusión en el estudio.

Varones que presenten cualquier enfermedad crónica o alteración genética conocida.

Tamaño muestral:

Para este estudio se reclutó una cohorte de **80 varones** distribuidos en los siguientes grupos:

- **20** pacientes con edad menor o igual a 25 años con normozoospermia (NZ).
- **20** pacientes con edad menor o igual a 25 años con oligozoospermia u oligoastenozoospermia (OAZ).
- **20** pacientes con edad mayor o igual a 40 años NZ.
- **20** pacientes con edad mayor o igual a 40 años OAZ.

Los pacientes fueron reclutados en IVI Madrid. A todos ellos se les realizó una historia clínica y exploración física para determinar posibles orígenes de una infertilidad, siendo motivo de rechazo en la inclusión para el estudio la presencia de una causa objetivable.

Todos los participantes fueron informados del estudio y éste no comenzó hasta que fue aprobado por un comité ético de investigación Médica.

Diseño y descripción de intervenciones:

Para realizar este estudio sólo se realizaron dos intervenciones: extracción de sangre y de esperma. Además, a los participantes se les realizó una historia clínica y una exploración física.

Recogida de muestras biológicas:

1. Recolección de muestras

A los varones del estudio se les recogieron las siguientes muestras:

- Se extrajeron 15 ml de sangre periférica en tubos con EDTA, el día del seminograma.
- Se recogieron muestra de semen según recomendaciones WHO para análisis de semen.

Todas las muestras recogidas fueron conservadas y analizadas en Fundación IVI-IVI Madrid y en la Universidad Rey Juan Carlos y almacenadas en el laboratorio de Investigación de la Fundación IVI en la Universidad Rey Juan Carlos para estudios relacionados con la ruta de los telómeros, una vez terminados este trabajo. El Dr. Carlos Balmori es la persona responsable de la guarda, custodia y conservación de las muestras biológicas.

Dichas muestras fueron codificadas, anonimizadas y solo el médico del estudio/colaboradores pudieron relacionar los resultados con los pacientes.

2. Método de obtención y conservación de las muestras.

Las muestras de **sangre** (15ml) se extrajeron de la vena cercana al codo. Los experimentos con la sangre se realizaron previa eliminación de los eritrocitos, que no tienen núcleo. Para ello se realizó un gradiente de ficoll (Histopaque, Sigma) y el resto de las células sanguíneas fueron congeladas a -80°C hasta que se dispuso de todas las muestras para hacer el análisis comparativo.

Las muestras de **semen**. Se obtuvieron mediante autoestimulación genital en las salas destinadas a tal efecto en la Clínica IVI Madrid. El participante en el estudio debió guardar entre 3 y 5 días de abstinencia. La muestra se recogió en frasco estéril de plástico con tapón de rosca. Una parte de la muestra fue congelada a -80°C para realizar medidas de actividad telomerasa y expresión génica. Otra parte fue fijada para estudiar la longitud telomérica del semen producido y la protección de los telómeros (shelterinas).

Variables de estudio

Variables teloméricas:

Las variables principales de este trabajo son la **longitud telomérica y la acumulación de telómeros cortos en las células**, que ha sido medida en sangre y semen. así como la **protección telomérica**, Otra variable por medir sería la expresión del **RNA mensajero de la telomerasa**.

La **longitud telomérica, acumulación de telómeros cortos en las células y TERRAs**. Estas variables se analizaron por el método de hibridación in situ con fluorescencia cuantitativa. La LT de la sangre y de los espermatozoides se midió por el método de hibridación in situ con fluorescencia cuantitativa a gran escala o HT Q-FISH, desarrollado en el laboratorio de la Dra. M. Blasco Para ello se fijaron los espermatozoides y las células de la sangre en placas de 96 pocillos. El ADN telomérico se desnaturalizó a 85°C y se hibridó con una sonda de 18 nucleótidos que contiene tres repeticiones teloméricas y que está marcada en un extremo con CY3. Después se realizaron lavados intensos para eliminar la sonda unida de manera inespecífica. Para la cuantificación de la señal se obtuvieron 40 imágenes de cada muestra con un microscopio confocal (Perkin-Elmer), tanto el canal del CY3 (señal telomérica) como el canal del DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) que tiñe los núcleos celulares. Las imágenes se analizaron con el programa Acapella. Primero el programa define el contorno de los núcleos celulares. Después, encuentra las señales de los telómeros y calcula la intensidad de fluorescencia de CY3 (telómeros). La información se exporta como "el valor medio de intensidad de CY3 de cada señal telomérica". En el caso de los espermatozoides se exportó la señal telomérica de CY3 por núcleo". El programa exporta los datos de intensidad en una hoja Excel.

El método tiene un límite de detección muy bajo (repeticiones teloméricas <0.1 kb) lo que permite la detección de telómeros críticamente cortos, partiendo de 1 o 2 millones de células. Los valores de fluorescencia se pueden convertir a Kb utilizando líneas celulares cuya longitud telomérica es conocida y estable.

Medida de la **protección telomérica**. Por un lado, se realizó inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos contra TRF1. Primero se permeabilizaron las células con 0,5% de Tritón X-100 a temperatura ambiente durante 1h. Se bloqueó con tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 5% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 1h a temperatura ambiente y después se añadió el anticuerpo anti TRF1 (que marca los telómeros) durante 1h, a 37°C. El exceso de anticuerpo primario se lavó con PBS y 0,1% Tween-20, durante 10 minutos a temperatura ambiente y, este paso, se repitió tres veces más. Después se añadieron los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos durante 45 minutos a 37°C y se lavan otra vez como se describió anteriormente. Al final se añadió DAPI y se realizó la adquisición de imágenes usando un microscopio confocal (Leica SP5).

Se calculó la intensidad de la señal producida por estos dos anticuerpos utilizando el programa Acapella.

Medida del **RNA mensajero de la telomerasa** por PCR cuantitativa. Primero se extrajo el ARN total de la sangre libre de eritrocitos y de los espermatozoides con TRIzol (Invitrogen). El RNA disuelto en etanol se purificó con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Después se sintetizó la hebra complementaria de DNA (cDNA) usando 1 µg de RNA, con el kit "Synthesis Kit" (BIO-RAD). Los niveles de transcripción del gen de la telomerasa o de las shelterinas se determinan usando oligonucleótidos (descritos abajo) y SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems). La PCR se lleva a cabo utilizando el sistema QuantStudio 6 Flex Real Time system (Applied Biosystems). El gen de interés se normalizó con respecto a genes housekeeping como GAPDH para CM y espermatozoides, actina para CM y 18S para espermatozoides que es más fiable que la actina en este tipo de células.

Los oligonucleótidos utilizados son:

- TRF1-F 5'-CTAAGCTAGGCCAGATGCCA-3'
- TRF1-R 5'-CTGAAATCTGATGGAGCACGT-3'
- GAPDH-F 5' GAGAGACCCTCACTGCTG-3'
- GAPDH-R-5' - GATGGTACATGACAAGGTGC-3'
- Actina-F-5'-CCTCATGCCATCCTGCGTCTG-3'
- Actina-R-5' - TTGCTCGAAGTCTAGGGCAACATAG-3'
- 18S-F-5' - GTTAAGGGAGTGAAGACGA TCAGA-3'
- 18S-R-5' - AACCCAAAGACTTTGATTC TCATAA-3'

Variables androgénicas:

El **seminograma** se hizo según las recomendaciones de la WHO, con abstinencia de haber eyaculado entre tres a cinco días previos a la toma de muestra. La muestra se tomó mediante masturbación en las salas destinadas a este fin en la clínica, de tal forma que se eviten las alteraciones por el traslado de muestra si esta se recolectaba fuera de las instalaciones.

Los seminogramas podían presentar las siguientes variables:

- Normozoospermia: Concentración de espermatozoides ≥ 15 mill/ml. Recuento total de espermatozoides en la muestra ≥ 39 millones.
- Oligozoospermia: Concentración de espermatozoides ≤ 15 mill/ml
- Astenozoospermia: Motilidad espermática, Espermatozoides progresivos (PR): $\geq 32\%$. Espermatozoides progresivos y no progresivos (PR+NP): $\geq 40\%$
- Oligoastenozoospermia: Muestras que muestren a la vez los parámetros de oligo y astenozoospermia.

Parámetros de fertilidad

Para estudiar los parámetros de fertilidad se limitó el estudio a los grupos de personas mayores de 40 años, que son lo que acuden a la clínica buscando la descendencia. Los cálculos se realizaron de acuerdo a las definiciones detalladas abajo:

- **Tasa de fecundación:** número de ovocitos fecundado con éxito (dos pronúcleos y dos cuerpos polares), dividido entre el número de ovocitos maduros (MII) totales.
- **Tasa de desarrollo de embriones hasta el estadio de blastocisto:** número de blastocistos dividido entre el número de ovocitos correctamente fecundados.
- **Tasa de gestación:** número de gestaciones dividido entre el número de transferencias embrionarias totales. La gestación es considerada positiva cuando los niveles de la β hCG son superiores a 5 mUI/ml, y estos continúan incrementando en los días sucesivos.
- **Tasa de recién nacido vivo:** número de recién nacidos vivos dividido entre el número total de embriones transferidos.
- **Tasa de aborto:** número de abortos dividido entre el número total de embriones transferidos. Se considera aborto, el fallo en el desarrollo de un embrión después de una transferencia e implantación (con test positivo de β hCG) con éxito.

4

RESULTADOS



4.1. Características de las personas reclutadas

Para entender el efecto de la ruta de los telómeros en la fertilidad masculina se reclutaron 80 personas en total, divididos en cuatro grupos (ver Materiales y Métodos), con seminograma NZ o con seminograma OAZ. Los grupos de personas menores de 25 años tenían una media de edad de 21.20 (N) y 22.33 (OAZ), mientras que los grupos de personas mayores tenían edades medias de 43.68 (N) y 44.20 (OAZ). En cuanto a los parámetros seminales, los grupos NZ de ambas edades presentaban mejores características que los grupos OAZ (Tabla1), notándose una caída importante en cuanto a la concentración de esperma en los grupos OAZ (12.56 y 14.38 en los grupos jóvenes y mayores respectivamente) (Tabla2).

Tabla 2. Edad y parámetros seminales de los individuos objeto de estudio.

	EDAD (medida \pm SD)	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN (106/ml)	MOVILIDAD PROGRESIVA (%)	MOVILIDAD NO PROGRESIVA (%)	MOTILIDAD PROGRESIVA TOTAL (106/total vol)
NZ < 25	21,20 \pm 2,11	3,98	72,46	55,98	14,87	152,3
OAZ < 25	22,33 \pm 2,49	2,58	12,56	24,00	21,53	6,12
NZ > 40	43,68 \pm 2,91	2,97	56,44	45,53	10,18	70,11
OAZ > 40	44,20 \pm 4,44	2,625	14,38	30,75	9,105	17,86

Los resultados de la tabla indican una deficiencia en las personas OAZ que se ha relacionado con dificultades en la fertilidad.

Una vez reclutados y caracterizados los individuos que participaban en el estudio, se procedió al análisis de las características teloméricas en las muestras recogidas.

4.2. Longitud Telomérica en sangre

El parámetro telomérico más relacionado con el envejecimiento es la longitud telomérica (100). El análisis de telómeros en sangre se realizó para estudiar la posibilidad de analizarlo como posible biomarcador no invasivo del estado telomérico en los espermatozoides. La medición, mediante FISH, de la LT en las CM muestra que las del grupo OAZ menores de 25 años es la más corta con respecto al resto de los grupos, y esta diferencia era estadísticamente significativa con cada uno de los grupos (Figura 6). Además, existe un acortamiento de la longitud de los telómeros, para los individuos NZ, en el grupo de los mayores de 40 años con respecto a los menores de 25 años, aunque no es significativo (Figura 6) que es probablemente debido al envejecimiento. El mismo tipo de tendencia al acortamiento telomérico con la edad debería haberse observado en los grupos de OAZ.

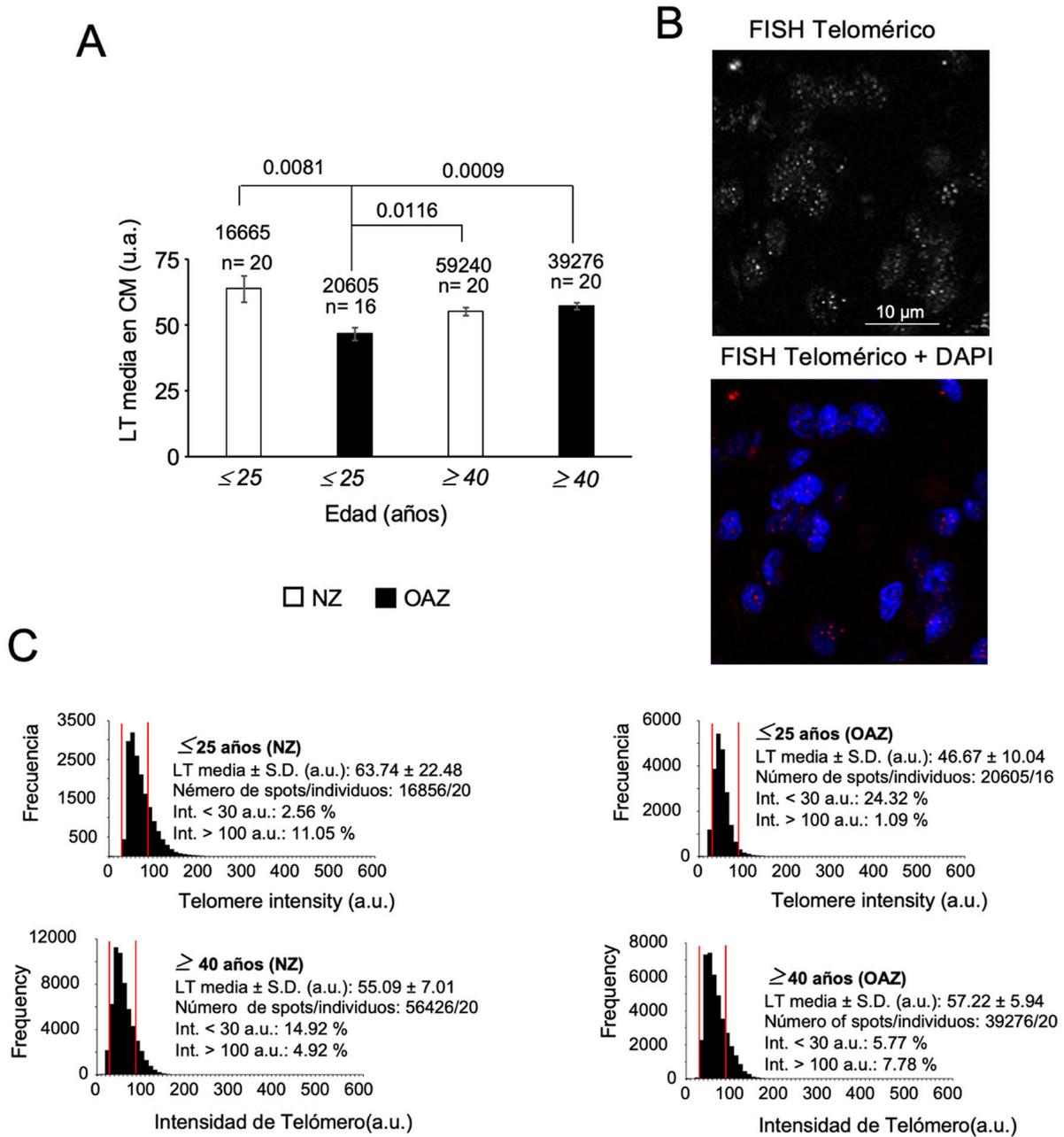


Figura 6: Longitud telomérica en la sangre. A: La gráfica muestra la longitud telomérica media en células mononucleares de la sangre de los individuos de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. B: Imágenes típicas de FISH telomérico. C: Las gráficas muestran histogramas de longitud telomérica de los individuos descritos en A. "n" indica el número de individuos analizados. El número que se encuentra encima de la "n" indica la cantidad de telómeros analizados en cada grupo. La barra de la micrografía es de 10 micrómetros. LT(longitud Telomérica), CM (Célula mononucleada), NZ (Normozoospermia), OAZ (Oligoasthenozoospermia).

4.3. Valoración de telómeros cortos y largos en sangre

La determinación de telómeros críticamente cortos es muy importante ya que son éstos los que determinan que las células puedan continuar dividiéndose o no. La sangre de los hombres jóvenes NZ mostró menor acumulación de telómeros críticamente cortos [percentil 15%] (104) comparado con los otros grupos de estudio. Las diferencias en la acumulación de telómeros cortos en los otros grupos no fueron estadísticamente significativas (Figura 7). Los resultados sugieren que los individuos jóvenes normozoospermicos son los que tienen mejores valores de longitud telomérica en la sangre.

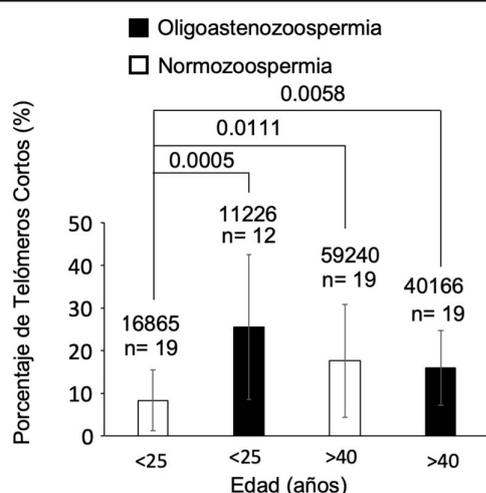


Figura 7: Porcentaje de Telómeros cortos en CM en cada grupo de estudio. La gráfica muestra el porcentaje de telómeros cortos en células mononucleares de la sangre de los individuos de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. "n" indica el número de individuos analizados. El número encima de "n" indica la cantidad de telómeros analizados.

Además de los telómeros críticamente cortos, se analizaron los telómeros largos, ya que se ha visto que dan ventajas en cuanto a la homeostasis de los tejidos en ratones (95). El análisis de telómeros largos (percentil 58%) mostró que los jóvenes con seminograma NZ tenían mayor cantidad de telómeros largo, indicando nuevamente que los NZ menores de 25 años tienen los telómeros de la sangre en mejores condiciones que cualquier otro grupo estudiado (figura 8).

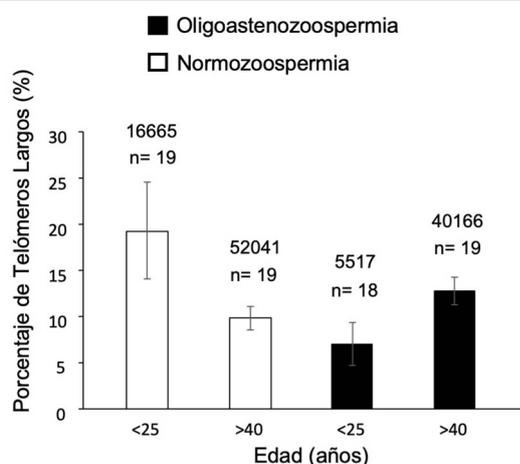


Figura 8: Porcentaje de Telómeros largos en CM en cada grupo de estudio. La gráfica muestra el porcentaje de telómeros largos en células mononucleares de la sangre de los individuos de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. "n" indica el número de individuos analizados. El número encima de "n" indica la cantidad de telómeros analizados.

4.4. Longitud telomérica en espermatozoides

Dado que los espermatozoides están directamente implicados en la fecundación del óvulo, y el contenido que aportan en la fecundación es importante para el desarrollo embrionario, se analizó la longitud media telomérica en los espermatozoides de los diferentes grupos de estudio.

El grupo de personas mayores de 40 años NZ presentó la longitud telomérica mayor (Figura 9). El alargamiento telomérico de los espermatozoides con la edad, ha sido mostrado anteriormente (110, 111, 117, 118, 120). En los histogramas se puede observar el pico de intensidad de los telómeros desplazado hacia la derecha (longitudes teloméricas mayores) (Figura 9). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) entre los grupos de NZ, así como para todos los demás grupos analizados. Interesantemente, no hay diferencia significativa en cuanto a la media de longitud telomérica entre los grupos OAZ (Figura 9). Estos resultados sugieren que los mecanismos de alargamiento telomérico en el espermatozoide con la edad pueden estar fallando en el grupo de individuos OAZ.

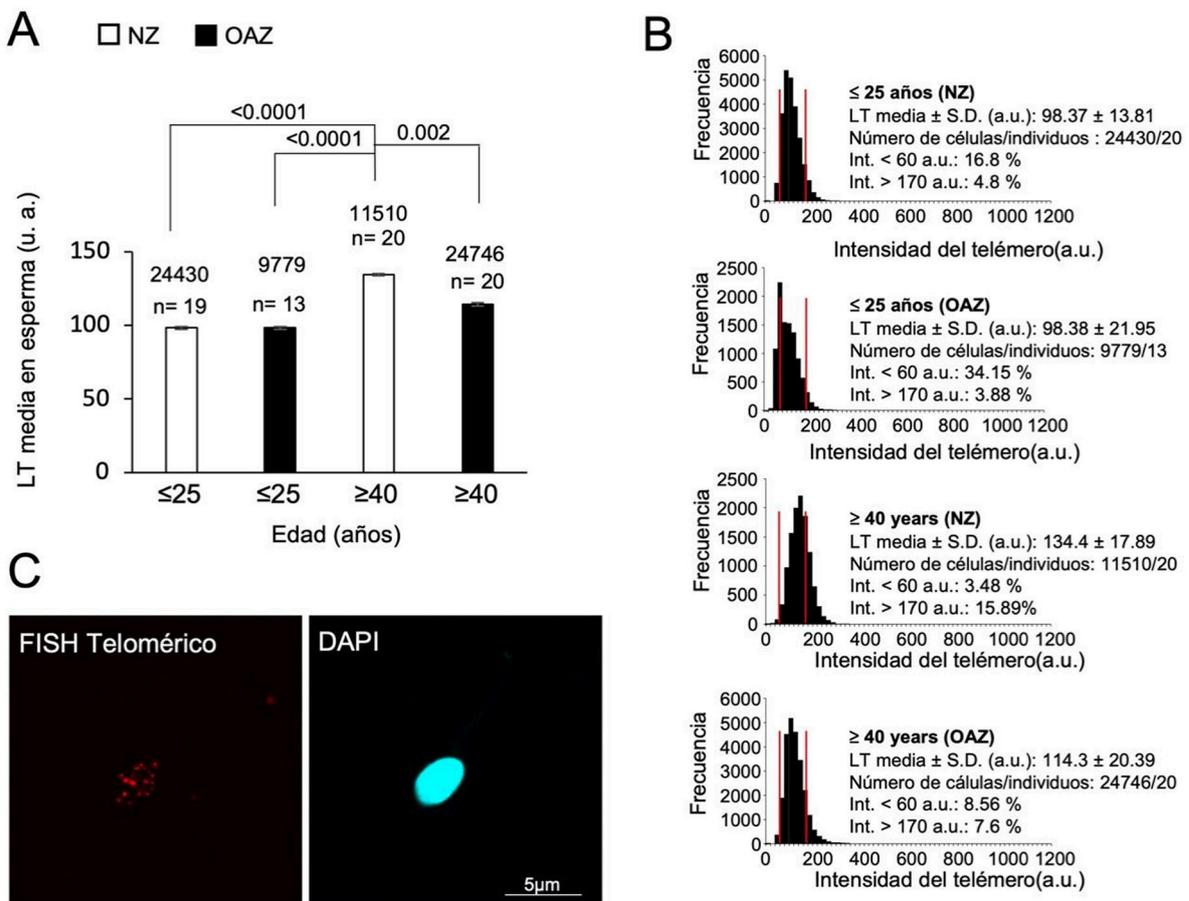


Figura 9: Longitud telomérica en muestras de espermatozoides. A: La gráfica muestra la longitud telomérica media en espermatozoides de los individuos de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤25) y mayores de 40 años (≥40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. B: Las gráficas muestran histogramas de longitud telomérica de los individuos descritos en A. C: Imágenes típicas de FISH telomérico. "n" indica el número de individuos analizados. El número que se encuentra encima de la "n" indica la cantidad de telómeros analizados en cada grupo. LT(longitud Telomérica), NZ (Normozoospermia), OAZ (Oligozoospermia).

4.5. Valoración de telómeros cortos y largos en espermatozoides

El porcentaje de telómeros cortos en espermatozoides es estadísticamente significativo ($p = 0.0295$) menor en los NZ mayores de 40 años que en los menores de 25. Esa distribución ocurre de la misma forma entre los grupos de OAZ. Existe aumento del porcentaje de telómeros cortos en el grupo de los OAZ menores de 25 años con respecto al de los NZ del mismo grupo de edad. Sin embargo, no hay casi variación entre el porcentaje de los grupos de mayores de 40 años (Figura 10).

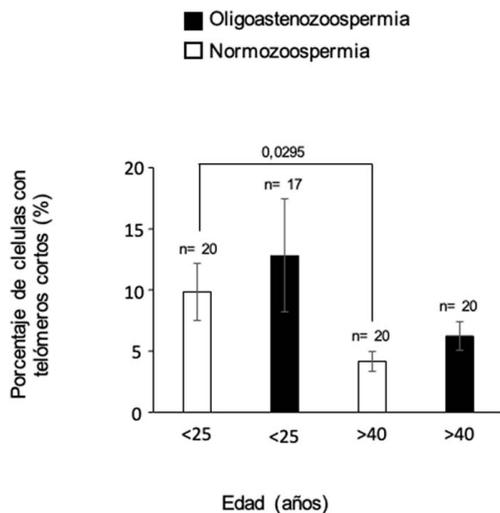


Figura 10: Medida de la acumulación de telómeros cortos en muestra de esperma. La gráfica muestra el porcentaje de telómeros cortos en espermatozoides de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. "n" indica el número de individuos analizados.

Con respecto a los telómeros largos en muestras de semen, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de telómeros largos en NZ a mayores de 40 años ($p < 0.0001$). Se observa además una marcada disminución del porcentaje de telómeros largos en los mayores de 40 años OAZ respecto a los NZ, siendo ésta significativa estadísticamente ($p = 0.0005$). Al contrario, el grupo de menores de 25 años OAZ presenta un mayor porcentaje de telómeros largos con respecto al grupo de NZ ($p = 0.0033$). Estos datos indican nuevamente que la maquinaria de elongación telomérica falla en el caso de los individuos OAZ. (Figura 11)

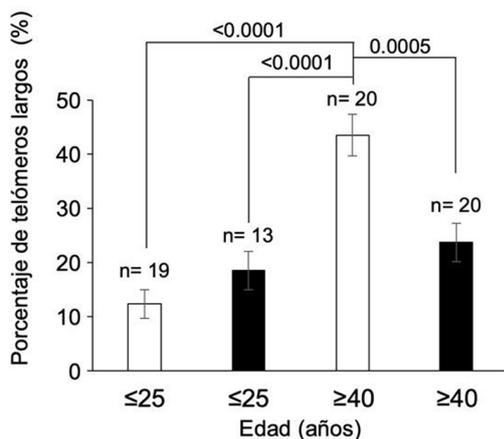


Figura 11: Porcentaje de Telómeros largos en espermatozoides. La gráfica muestra el porcentaje de telómeros largos en espermatozoides de los individuos de los diferentes grupos de edad y parámetros seminales (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. "n" indica el número de individuos analizados. ANOVA p value < 0.0001 .

4.6. Medidas de protección telomérica

Se ha planteado estimar la cantidad de TRF1 como medida de la protección de los telómeros, al ser ésta una proteína del complejo shelterina.

La primera opción fue marcar TRF1 con anticuerpos fluorescentes y evaluar la intensidad de TRF1 en los diferentes grupos de estudio (La presencia de TRF1, es menor en los grupos de OAZ con respecto a los NZ, pero no de una manera significativa (Figura 12). Lo cual indica que los telómeros de la sangre de las personas de todos los grupos están protegidos de igual manera. Se observa una disminución de la cantidad de TRF1 en los OAZ jóvenes, lo cual estaría en consonancia con la menor longitud telomérica encontrada en este grupo.

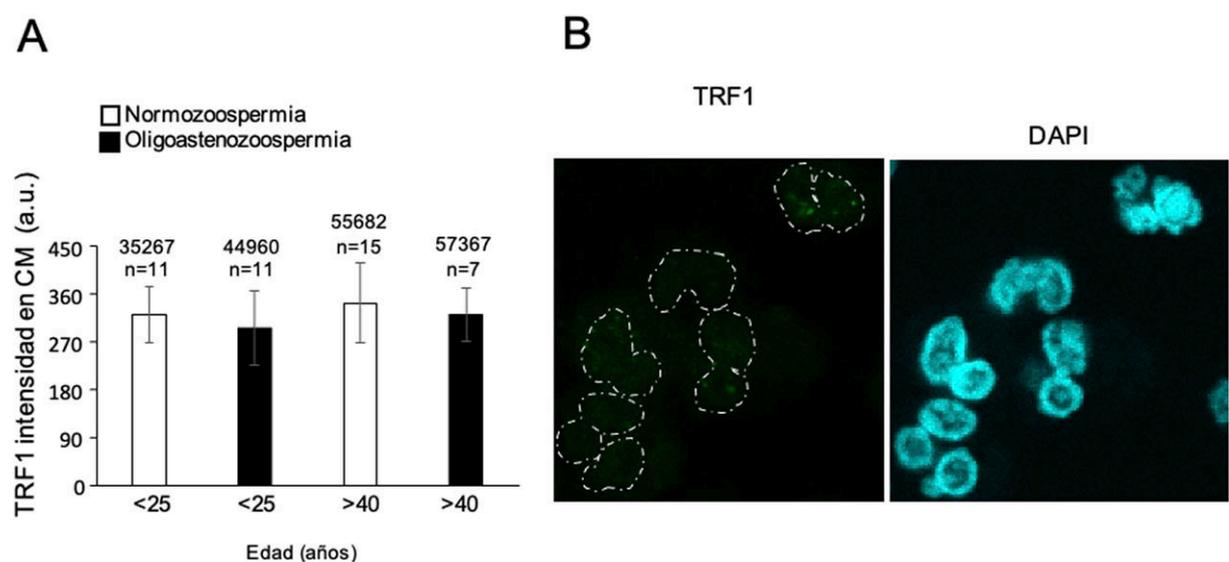


Figura 12: Medida de los niveles de TRF1 en sangre. A: la gráfica muestra los niveles de TRF1 en los grupos de estudio (menores de 25 años (≤ 25) y mayores de 40 años (≥ 40) de seminograma NZ (cuadrado blanco) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura. B: Imágenes típicas de inmunofluorescencia de TRF1. Cada señal representa la proteína TRF1 localizada en un telómero. "n" indica el número de casos analizados. El número encima de "n" representa la cantidad de puntos de TRF1 analizados en cada grupo.

Cuando esta técnica se llevó a cabo usando muestras de espermatozoides, no hubo éxito en ninguno de los intentos. Para poder tener una estimación de la cantidad de TRF1 en las muestras de espermatozoides, se analizaron los niveles de RNA mensajero mediante la técnica de RT-PCR (Materiales y Métodos).

La medida de la expresión del gen *TRF1* utilizando dos controles permite confirmar que los resultados no son debidos al azar. Se ha observado la misma distribución de la expresión del gen *TRF1* para cada grupo de estudio independientemente del control utilizado. El gen *TRF1* en CM se expresa menos en los grupos OAZ de cualquier grupo de edad, pero sin significación estadística (Figura 13A). En el caso del gen en espermatozoides hay un claro aumento de expresión de este en el grupo de NZ mayores de 40 años con respecto a los menores de 25 años, p 0.021 utilizando GAPDH, p 0.0182 utilizando 18S. También el gen *TRF1* tiene mayor expresión en los OAZ menores de 25 años con respecto a los NZ de este mismo grupo de edad (p 0.0182 utilizando GAPDH, p 0.0423 utilizando 18S) (Figura 13B).

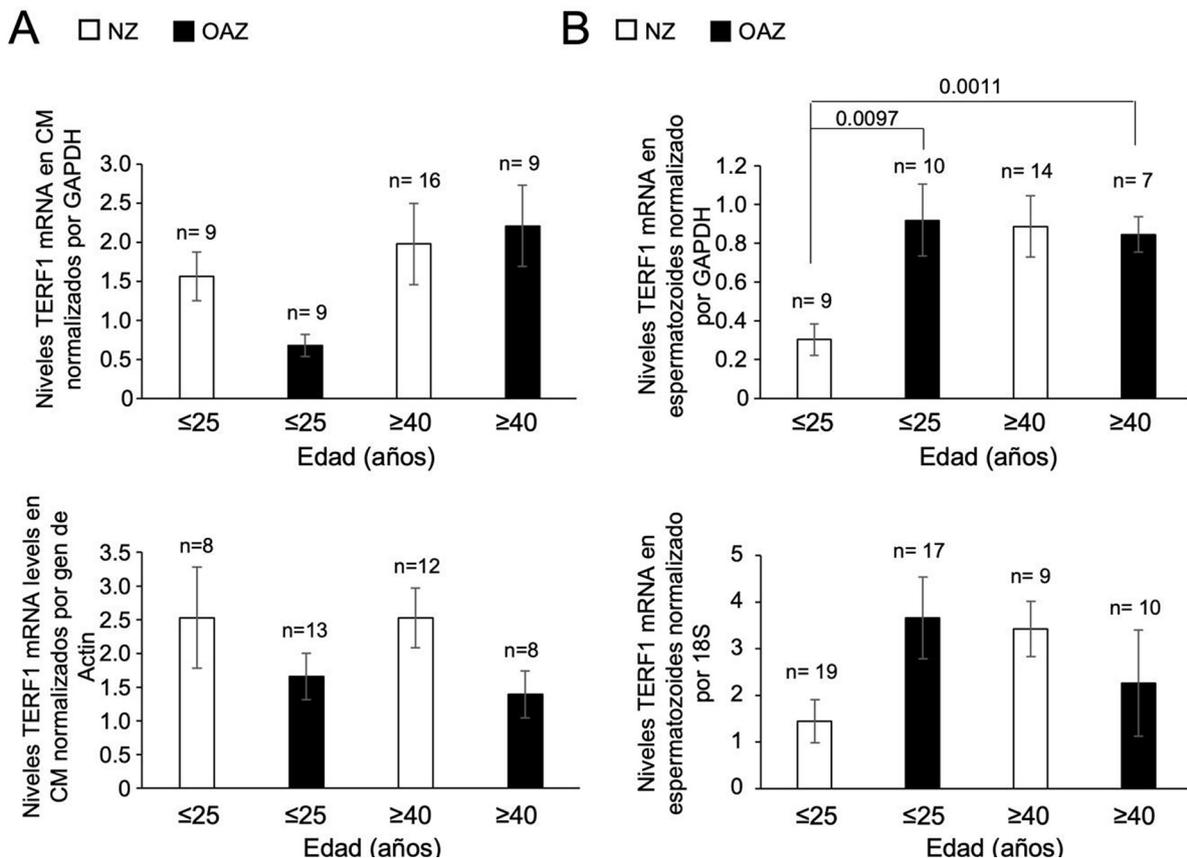


Figura 13: Medida de los niveles de mRNA del gen que codifica TRF1. A: las gráficas muestran los niveles de mRNA normalizados con GAPDH o Actina en muestras de sangre, en los grupos de estudio. estudio (menores de 25 años (≤25) y mayores de 40 años (≥40) de seminograma NZ (cuadrado vacío) u OAZ (cuadrado negro), según está indicado en la figura). B: las gráficas muestran los niveles de mRNA en muestras de esperma normalizados con GAPDH y 18S, en los grupos de personas indicados en A. "n" representa el número de muestras analizadas.

4.7. Efectos de la longitud telomérica en la fertilidad

Tras realizar los análisis de longitud telomérica, el siguiente paso necesario era el estudio del impacto de los telómeros en la fertilidad y saber si la longitud telomérica del esperma puede servir como biomarcador de los resultados de fertilidad.

Resultados de fertilidad usando ovocitos donantes

Para analizar los resultados de fertilidad se observó únicamente el grupo de mayores de 40 años, dado que el grupo de jóvenes normalmente no realizan tratamientos de reproducción asistida. Para descartar el factor femenino y poder centrarnos en el efecto sobre la fertilidad del factor masculino, sólo se analizaron las parejas que recurrieron a ovocitos donados.

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados de fertilidad de las parejas tras la fecundación de los ovocitos mediante ICSI, usando el esperma de los grupos del estudio. En general los resultados de fertilidad tras el método de ICSI tuvieron más éxito en el grupo de personas NZ, aunque en algunos

de los factores analizados no hubo diferencia significativa entre los grupos. Cabe destacar que con respecto a la tasa de fecundación los valores son similares, probablemente porque el método ICSI está facilitando ese proceso. Las tasas de embarazo bioquímico, de recién nacido vivo y de recién nacido vivo en el primer intento de transferencia embrionaria, fueron más altas y estadísticamente significativas en el grupo de normozoospermicos (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de fertilidad después de ICSI usando ovocitos donados.

	Normos >40	OAs >40	p-value
N*	13	11	-
Nº de ciclos	15	11	-
Nº de ovocitos fertilizados por ovocitos MII	0,756 ± 0,083	0,792 ± 0,123	NS
Nº de blastocistos fertilizados por ovocito	0,765 ± 0,079	0,640 ± 0,245	NS
Nº de embriones transferidos	14	21	-
Nº de embarazos bioquímicos*	13/14 (92,86%)	9/21 (42,86%)	0,0039
Nº de abortos bioquímicos*	1/14 (7,14%)	3/21 (14,29%)	NS
Nº de nacidos vivos*	12/14 (85,71%)	8/21 (38,10%)	0,0069
Nº de nacidos vivos en el primer intento de transferencia*	11/14 (78,57%)	6/21 (28,57%)	0,0059

* Estos ratios fueron calculados teniendo en cuenta el número de embriones transferidos.

4.7.1. Efecto de la longitud telomérica en la tasa de fecundación

Se ha publicado mucho del alargamiento telomérico en los espermatozoides con la edad, pero no se sabe claramente cuál es el significado de este cambio en los telómeros. Para entender este punto se correlacionó la longitud telomérica de los espermatozoides con la tasa de fecundación en los grupos de estudio (en este caso mayores de 40 años NZ y OAZ). En el caso de los individuos NZ, existe una tendencia positiva, es decir, a mayor longitud telomérica del esperma, mayor tasa de fecundación. Sin embargo, en los individuos OAZ, esta tendencia se pierde, de manera que la longitud telomérica no parece favorecer la fecundación (Figura 14).

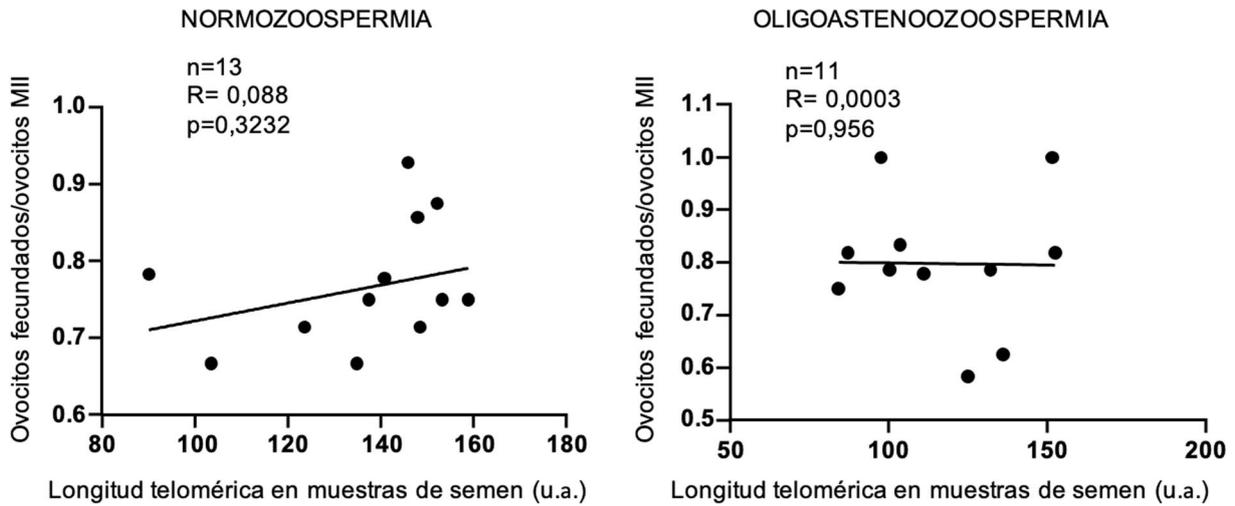


Figura 14: Análisis de correlación de la tasa de fecundación. La gráfica de la izquierda muestra la correlación entre la tasa de fecundación y la longitud telomérica del esperma en el grupo de mayores de 40 años con seminograma NZ. La gráfica de la derecha muestra la misma correlación descrita anteriormente, pero con el grupo de personas mayores con seminograma OAZ.

4.7.2. Efecto de la longitud telomérica en la tasa de desarrollo a blastocisto

Para estudiar si la longitud telomérica afecta al desarrollo del embrión en sus estadios tempranos, se correlacionaron los valores de longitud telomérica con la tasa de desarrollo a blastocisto. En el caso de los individuos NZ se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre LT y el número de blastocisto, de manera que a mayor LT mayor posibilidad de llegar al estadio de blastocisto. En el caso de los individuos OAZ, esta correlación desaparecía. Hay que tener en cuenta que los telómeros en el esperma de estos individuos no eran tan largos en media, como en el caso de los individuos NZ (Figura 15).

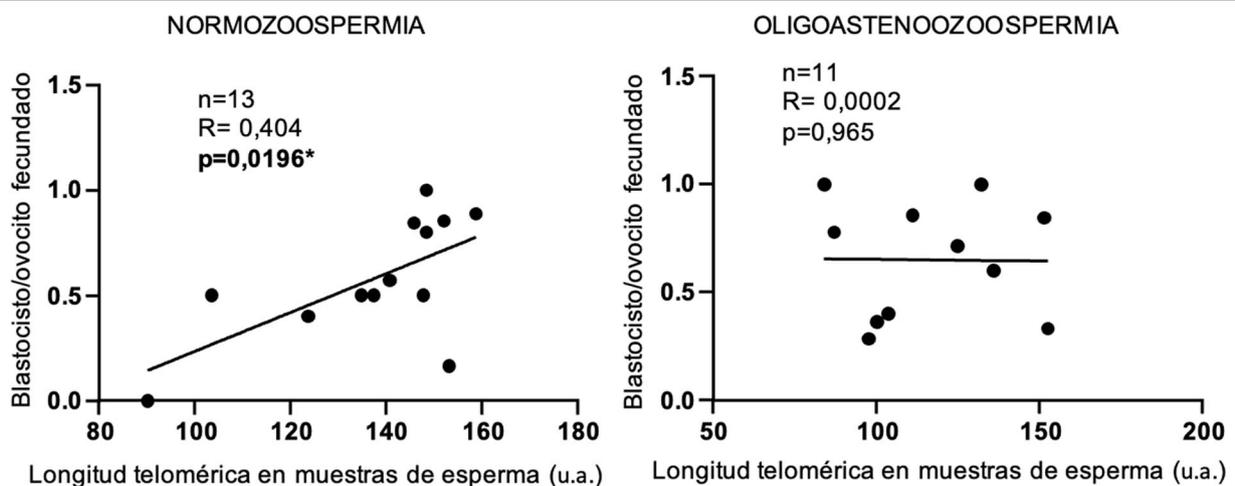


Figura 15: Análisis de correlación de la tasa de formación de blastocistos. La gráfica de la izquierda muestra la correlación entre la tasa de blastocistos y la longitud telomérica del esperma en el grupo de mayores de 40 años con seminograma NZ. La gráfica de la derecha muestra la misma correlación descrita anteriormente, pero con el grupo de personas mayores con seminograma OAZ.

5

DISCUSIÓN



La infertilidad es un tema de preocupación general dado que afecta tanto a la vida de la pareja como a la sociedad en general, que ha experimentado una bajada de natalidad durante los últimos años. En España, el índice de fecundación (número medio de hijos por mujer) fue de 1.24 en 2019 y la tasa de natalidad (número de nacimientos por cada mil habitantes) fue de 7.62% en 2019. En España el 17% de las parejas tiene problemas de infertilidad, y entre el 40 -50% de los casos se debe al factor masculino (141).

En este marco, la posibilidad de encontrar biomarcadores en los varones que presentan problemas reproductivos se hace necesario, dado el alto porcentaje de infertilidades denominadas idiopáticas. Un correcto diagnóstico del origen de la infertilidad, sus posibles tratamientos o el análisis de las posibilidades reales de que ese varón pueda tener descendencia son muy necesarios para minimizar los costes psicológicos y económicos que pueden suponer iniciar cualquier tipo de tratamiento de reproducción. Además, tanto el diagnóstico precoz como el posible tratamiento de la infertilidad redundará en beneficios para la sociedad.

Con esta premisa se inició este trabajo, buscando biomarcadores, en este caso dentro del complejo telomérico que pudieran ayudar a diagnosticar y tomar decisiones en el caso de que el varón deseara tener descendencia.

Para ello se tomaron dos grupos etarios de pacientes, los de menos de 25 años, que podíamos considerar como el grupo de jóvenes y el de más de 40 años que corresponde al grupo de hombres mayores. Se escogieron estos límites para poder incluir al mayor número de pacientes en ambos grupos y que tuvie-

ran una diferencia de edad suficientemente amplia como para ver diferencias en los factores teloméricos. Los menores de 25 años corresponden en su mayoría a jóvenes que acuden a donar muestras de semen y por tanto hay una población amplia para elegir. Más difícil era encontrar suficientes varones de edades superiores a 50 ó 60 años, que quizá representan edades avanzadas y que acudan a una clínica de reproducción asistida, por lo que se estimó que a partir de los 40 años era más probable conseguir los pacientes necesarios para el estudio.

Con estas premisas se esperaba, en primera instancia, poder confirmar lo que se ha publicado sobre la dinámica telomérica, dado que esto suponía un apoyo para poder abarcar nuevos interrogantes sobre el sentido biológico de los cambios teloméricos que se producen con la edad, sobre en la línea germinal masculina y su relación con la fertilidad.

5.1. Longitud telomérica en células mononucleares

La relación inversa entre la edad y la LT en células somáticas está ampliamente demostrada y sirve de base para utilizar la LT como un biomarcador del envejecimiento biológico (142). Los telómeros se van acortando con la edad y la tasa de acortamiento telomérico, que es fija dependiendo de las especies, sirve como marcador de la longevidad de la especie (104,143). Hay variabilidad tanto en la longitud telomérica de cada individuo como en el acortamiento telomérico, que parece ser más lento durante la niñez y el adulto joven, acelerándose progresivamente en el adulto mayor (144). Estos patrones de acortamiento telomérico se pueden ver modificados por diversos factores como el estilo de vida (145), la exposición a agentes contaminantes (146) al estrés oxidativo (147) o a alteraciones genéticas (148). Ya que es conocido el ritmo y límite de replicación celular, de acuerdo con una determinada LT de los leucocitos, se puede estimar el tiempo de vida saludable de un individuo, esto significa utilizar la LT de leucocitos como biomarcador de envejecimiento (149), es decir, que los telómeros reflejan la edad biológica del individuo, y no la edad cronológica. En nuestro estudio los hallazgos del LT en CM sanguíneas siguen esta distribución para los individuos de los grupos **normozoospermicos**. Existe una **longitud telomérica menor en células somáticas**, en este caso células mononucleares sanguíneas, **de los hombres mayores de 40 años con respecto a los menores de 25 años**.

La evidencia actual respalda la idea de que la longitud telomérica está asociada con una serie de afecciones crónicas, relacionadas con el envejecimiento que incluyen dislipidemia (150), hipertensión (151, 152), aterosclerosis (153, 154), accidente cerebrovascular (155), enfermedad de las arterias coronarias (156, 157), infarto de miocardio (158) y mal pronóstico de enfermedad cardiovascular (155, 159, 160). La acumulación de telómeros cortos en los leucocitos también se asocia a diversos tipos de cáncer como el cáncer colorrectal (161, 162), de ovario y mama (163), gástrico (164), así como una mayor incidencia y mortalidad general debida al cáncer (165). Además, varios estudios indican que el acortamiento telomérico se correlaciona positivamente con la diabetes y las complicaciones diabéticas (166–168). Por ejemplo, entre los diabéticos tipo 2, aquellos que experimentan complicaciones como la nefropatía

diabética tienen longitudes de los telómeros leucocitarios más cortos que los individuos sin complicaciones y los que no tienen diabetes (169).

Atendiendo a esta relación entre patología y alteración de la LT, en nuestro estudio, la longitud telomérica en los pacientes **oligoastenozoospermicos** invertía su proporción entre los grupos de edad, **los menores de 25 años presentaron telómeros más cortos que los mayores de 40 años**. La explicación a esta situación pensamos que se puede deber a que, en el caso de los pacientes mayores, realmente no hay una patología, si no una evolución natural del proceso de envejecimiento, mientras que en **los menores de 25 años si pudiera existir una patología no evidente** en un análisis rutinario o podría deberse al número menor de individuos reclutados y la **alta variabilidad de longitud telomérica** entre individuos, habiéndose reclutado demasiados con una media de longitud telomérica baja para su edad. La situación por tanto, es parecida en cuanto al diagnóstico de la infertilidad masculina previa al estudio: no podemos diagnosticar con estos elementos la causa. Ahora bien, lo que si pudiera ser factible es hacer determinaciones de longitud telomérica en pacientes jóvenes para valorar, en el caso de una oligoastenozoospermia, si esta situación sólo es un indicativo de alteración seminal o si la afectación es general a todas las células del individuo. También se podría analizar longitud telomérica en un número mayor de personas para esclarecer más la situación.

5.2. Cuantificación de telómeros cortos y largos en células mononucleares

En la mayoría de las células somáticas, las repeticiones teloméricas se pierden a través de varias vías, como se ha mencionado más arriba (170). La telomerasa compensa parcialmente dichas pérdidas (171), pero no puede evitar el acortamiento telomérico (99). Cuando al menos 5 telómeros son críticamente cortos, la célula ya no puede dividirse y sufre apoptosis o se vuelve senescente (100). La telomerasa es capaz de mantener la longitud de los telómeros en las células de la línea germinal, pero el acortamiento continuo de los telómeros es una característica del envejecimiento (172). En pacientes de familias con mutaciones en los genes de la vía de mantenimiento de los telómeros, los telómeros son más cortos con cada generación (173), y también afectan a la fertilidad de las personas, mostrando éstos valores más bajos de hormonas sexuales, y tasas más bajas de euploidía y fecundación (174).

Existen trabajos que apoyan el carácter hereditario, y por tanto genético de acumulación de telómeros cortos antes de que se desarrollen clínicamente determinadas patologías como la arteriosclerosis (175). Aunque factores externos, como la exposición a radicales libres o situaciones de estrés pueden acortar los telómeros, la presencia de telómeros cortos en la niñez tiene una gran dependencia de la edad paterna. Cuanto menor es la edad paterna, menor LT en la descendencia (124, 125). Si bien la disminución de la LT de las CM en sangre es un biomarcador de senectud o de posible desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento, en otros casos, se ha visto que los telómeros cortos pueden tener un efecto protector sobre, por ejemplo, el riesgo de melanoma (176). Esto nos obliga a ser cautos con el

significado de los resultados que hemos obtenido en cuanto a la determinación de telómeros cortos y largos. Sí es coincidente la distribución del porcentaje de telómeros cortos con los datos obtenidos de la LT en CM sanguíneas. **El porcentaje de telómeros cortos mucho mayor en el grupo de los pacientes menores de 25 años con oligoastenozoospermia** con respecto a cualquiera de los otros grupos nos habla de una limitación en cuanto a la división celular, lo que podría hacer peligrar *el futuro reproductivo del paciente y muy posiblemente habría que prestar atención a la salud general de este individuo*, ya que como hemos expuesto estará sometido a un mayor riesgo de patologías en futuro. Además, **los jóvenes de 25 años obtuvieron el menor porcentaje de telómeros cortos**, lo cual sugiere que tendrían más ventajas en su salud general y en la reproductiva. Ya hemos visto que existen numerosos estudios que correlacionan la LT con procesos oncológicos, en el caso de la infertilidad masculina también hay estudios en esa dirección, llegando a identificar a la infertilidad masculina como un biomarcador de riesgo de cáncer tanto para el paciente como para sus familiares (177, 178).

5.3. Longitud telomérica en células espermáticas

En los seres humanos, las células madre de la línea germinal masculina experimentan muchas más repeticiones que las de la línea germinal femenina (179). Ésta es la razón por la que el factor paterno en humanos y quizás en otros primates es la principal fuente de mutaciones de novo en la línea germinal en la descendencia (180). Las numerosas repeticiones de células madre en la línea germinal masculina humana también podrían explicar el efecto de la edad paterna al momento de la concepción (EPC) sobre la LT. Mientras que las células madre somáticas experimentan un acortamiento de los telómeros dependiente de la edad, los espermatozoides de los hombres mayores muestran telómeros comparativamente más largos (118, 181, 182). Esta situación se manifiesta en nuestro estudio para los grupos de **varones normozoospermicos, existiendo una LT mayor en el grupo de los mayores de 40 años**, que se ven refrendadas con **la determinación del porcentaje de telómeros cortos y telómeros largos que siguen esa misma distribución** de una manera significativa. Resultados similares en cuanto al aumento de longitud telomérica con la edad se habían observado con anterioridad (120, 136, 183). Estos resultados ponen de manifiesto que en las etapas jóvenes de la vida la media más baja de LT del esperma no es impedimento para la fertilidad. Sin embargo, con la edad, una media de longitud telomérica similar a la encontrada en personas jóvenes, limita la fertilidad. De hecho, La LT está positivamente asociada con la movilidad progresiva y vitalidad de los espermatozoides y negativamente con la fragmentación del ADN espermático y, por tanto, los varones con LT mayor en el esperma, tendrán menos problemas reproductivos asociados a la calidad seminal (137).

La LT aparentemente será heredada por la descendencia (184, 185). Así, la progeñie concebida por padres mayores tiene telómeros más largos que sus pares (124, 181, 186). El efecto EPC sobre TL también se ha observado en chimpancé (128), lo que sugiere un papel importante dentro de la evolución de las especies de homínidos. La literatura sobre telómeros proporciona resultados contradictorios sobre el

modo de herencia de la LT (187–189), sin embargo parece demostrado que la LT se ve más afectada por el linaje materno que por el paterno (190, 191). Por lo tanto, la LT de la descendencia está influenciada a través de distintos canales maternos (mayor herencia) y paternos (EPC); y estos efectos ya son evidentes en los recién nacidos (190). En particular, el modo de herencia y el efecto de la edad de los padres difieren en varias especies. Por ejemplo, LT es hereditaria en el lagarto de arena y muestra EPC sobre LT en la descendencia masculina (192). En las aves, la LT también se hereda, principalmente a través del linaje materno (193,194), y puede mostrar un efecto de la edad materna en el momento de la concepción en la descendencia LT (137).

En lo relativo al factor masculino, las anomalías cromosómicas debidas a la no disyunción meiótica, así como el daño del ADN, son más comunes en los espermatozoides subfértiles en comparación con la población general (195–197). Aunque la disfunción de los telómeros como componente de la infertilidad masculina está menos establecida en la literatura En el estudio de Biron-Shental (2017), se observó que la homeostasis de los telómeros estaba significativamente alterada entre las muestras de espermatozoides subfértiles (198). Los espermatozoides subfértiles tienen telómeros más cortos y una mayor formación de agregados, lo que implica disfunción. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran ese **acortamiento de los telómeros entre las poblaciones de varones oligoastenozoospermicos mayores de 40 años**, así como una **disminución significativa de los telómeros largos** lo que sugiere fallos en los mecanismos de alargamiento de telómeros en estas personas, que de acuerdo a lo publicado está relacionado con ese nivel subóptimo de la calidad seminal (120, 137). Se han barajado como origen de ese acortamiento, unos niveles menores de telomerasa en el testículo medidos por el número de copias del gen componente RNA de la telomerasa (TERC) y una mayor compensación por captura de telómeros. Estas observaciones podrían ser un hallazgo clave para que los estudios de intervención mejoren la calidad del esperma, pero requiere más investigación (198). De hecho, en nuestro estudio se muestra un porcentaje más elevado de telómeros cortos y largos en menores de 25 años oligoastenozoospermicos respecto a los normozoospermicos de la misma edad que nos plantea la duda, por tanto, si esto es debido a un mecanismo compensatorio para mantener la fertilidad o es una desregulación del complejo telomérico.

5.4. Medida de la protección telomérica

La presencia de la proteína TRF1 en los telómeros puede representar el nivel de protección telomérico, que confiere el complejo de las shelterinas, encargadas de proteger los telómeros (100). TRF1 y TRF2 son proteínas de unión a ADN telomérico bicatenario (79,199,200). Para ellos forman dímeros y se unen la una a la otra gracias a que presentan un dominio de homología TRF (TRFH) que media la dimerización y un homeodominio C-terminal que históricamente ha sido descrito como un dominio de unión a ADN SANT/Myb-like (199–201)

TRF1 es un componente esencial del complejo Shelterina y está enriquecido en células madre adultas y

pluripotentes (84), indicativo de su papel en la protección de los telómeros. La sobreexpresión de TRF1 promueve el acortamiento de los telómeros, mientras que se ha demostrado que la pérdida de TRF1 de los telómeros induce el alargamiento de los telómeros dependientes de la telomerasa, lo que implica que TRF1 regula negativamente la extensión de los telómeros dependientes de la telomerasa, quizás al restringir el acceso de la telomerasa a los extremos de los telómeros (202–204). Además, se ha demostrado que TRF1 interactúa con la proteína cohesina SA1 (205) así como con la proteína de unión a microtubos EB(206). TRF1 se ha implicado en la regulación del huso mitótico así como en la resolución de los telómeros hermanos (166,206–208). La sobreexpresión de TRF1 que carece del sitio de fosforilación para la quinasa 1 dependiente de ciclina B (Cdk1) conduce al bloqueo de la resolución de los telómeros hermanos (207). En nuestro trabajo la proteína TRF1 fue medida por Inmunofluorescencia en las células mononucleares sanguíneas, no pudiendo reproducirse el experimento sobre los espermatozoides. Se observó una **tendencia a la disminución de la proteína TRF1 en los grupos de oligoastenozoospermicos tanto menores de 25 años como mayores de 40**. La tendencia a la disminución de expresión de TRF1 con la edad se ha observado en humanos y ratones y supone una falta de protección telomérica que lleva al deterioro del organismo (85). Esta tendencia, aunque no estadísticamente significativa, también se ratificó mediante la estimación de la expresión del gen codificador de TRF1 en sangre determinado por RT-PCR con dos controles, GAPGH y actina.

No obstante, en sangre no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de TRF1 entre los grupos, lo cual sugiere que **este parámetro telomérico no se podría usar como biomarcador** para detectar los problemas de infertilidad del factor masculino.

La misma determinación del gen codificador de TRF1 se utilizó en espermatozoides debido, como se ha dicho a la imposibilidad de determinar directamente la proteína TRF1. En este caso se utilizó también GAPDH, pero se cambió actina por 18S debido a su mayor fiabilidad y presencia en espermatozoides (209). Al comparar eyaculados con contaminación importante de células redondas con otros eyaculados bajos en células redondas se observó que el mRNA 18S era más fiable para la cuantificación (209). En nuestro estudio, **con ambos controles, en la cuantificación del ARNm de TRF1 con GAPDH y 18S se obtuvieron resultados similares**. Se muestra una **mayor expresión del gen TRF1 en todos los individuos mayores de 40 años normozoospermicos, comparados con los jóvenes normozoospermicos**. Sin embargo, en los **niveles de expresión del gen en varones con oligoastenozoospermia es mucho mayor que en los normozoospermicos del mismo grupo de edad** e incluso mayores que para los oligoastenozoospermicos mayores de 40 años. En cuanto a los mayores de 40 años con seminograma NZ, la proporción es lógica ya que los telómeros son más largos, y por tanto, habría que proteger más cromatina. En el caso de los oligoastenozoospermicos, esta no sería una explicación ya que la media de longitud telomérica en el esperma es menor. Teniendo en cuenta que el espermatozoide tiene una función muy concreta, cabría pensar que la mayor cantidad de TRF1 se va a aportar al cigoto en previsión del alargamiento telomérico que sucede durante las etapas tempranas de desarrollo embrionario (94,95), ya sea por recombinación (210) o por activación de la telomerasa en el estadio de blastocisto (93). También se

cabría pensar que puede existir **un intento de compensar el daño celular mediante una mayor expresión del gen TRF1**. Serán necesarios más estudios para determinar la causa de este aumento y si tiene beneficios el mantenimiento de mayores niveles del gen TRF1.

5.5. Efecto de la longitud telomérica en la fertilidad

La longitud telomérica es muy importante para la meiosis y en la reproducción. En el primer caso, porque asegura el anclaje de los cromosomas a la envoltura nuclear, promoviendo la recombinación cromosómica (211). En cuanto a la reproducción, en el espermatozoide la cromatina está empaquetada gracias a las protaminas, con excepción de algunas zonas que contienen nucleosomas aún después de la fecundación (212). Una de esas zonas son los telómeros (213), tanto en ratones como en humanos (214). Estos nucleosomas que conservan marcas epigenéticas paternas podrían regular la expresión de genes en el embrión temprano (215). Por tanto, una longitud telomérica excesivamente corta en los espermatozoides pondría en peligro ambos procesos biológicos. En este sentido, encontramos una **correlación positiva entre la tasa de fecundación y la longitud telomérica del espermatozoide** en individuos normozoospermicos, que también ha sido observada por otros grupos (136, 216). De hecho, los espermatozoides con telómeros cortos no se unirían a la membrana nuclear de manera eficiente, que es lo que promueve la descompactación de la cromatina y la formación del pronúcleo (217). En cualquier caso, la correlación observada entre la longitud telomérica y la tasa de fecundación no fue significativa, lo cual podría deberse al hecho de haber hecho la fecundación por el método ICSI. Este método introduce el espermatozoide dentro del óvulo, facilitando enormemente el proceso de la fecundación. Interesantemente se observó una **correlación positiva significativa entre la tasa de formación de blastocistos y la longitud telomérica del espermatozoide**, lo cual sugiere que el aporte paterno es muy importante para el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto, concretamente el aporte de telómeros largos. **En hombres con seminograma oligostenozoospermico, la correlación desaparecía**, incluso en aquellos individuos que tenían los telómeros más largos. Esto podría deberse a que estos espermatozoides tuvieran otro tipo de alteraciones en el genoma que dificultaran el desarrollo a blastocisto. De hecho, los espermatozoides con telómeros cortos se han relacionado con una mayor fragmentación del DNA (137).

6 **LIMITACIONES**



Las principales limitaciones al estudio con las que nos hemos encontrado son las siguientes:

1. Tamaño muestral

Es evidente que la extrapolación de datos se hace complicada con el tamaño muestral reducido. La selección e introducción de varones normozoospermicos menores de 25 años no presentaba grandes problemas al tratarse de donantes que en su mayoría repiten tomas de muestras cuando presenta esa normalidad en los parámetros seminales. La introducción de los otros grupos se hace más complicada. En el caso de los menores de 25 años, por que dependíamos de su deseo de dejar más muestras, aunque se les hubiera comentado que no servían como donantes. Para los mayores de 40 años el problema es vencer las reticencias que les podía plantear el uso que se iba a dar a esas muestras por ser individuos que están dentro de procesos de reproducción asistida. A este problema hay que añadir que una vez recogidas todas las muestras una primera vez, un fallo en uno de los congeladores, hizo que se perdieran numerosas muestras y hubo que iniciar una nueva fase de reclutamiento de pacientes.

2. Tratamiento de las muestras

Encontramos varios tipos de problemas:

- *Descongelación de alícuotas:* Para las muestras de sangre no existían problemas en la división de alícuotas para estudio, sin embargo, en las muestras de espermatozoides hubo que unificar la manera de criopreservar las muestras ya que si se hacían en pajuelas era muy difícil su división, por lo que se aplicó el criterio de congelar en píldoras para su manipulación individual sin deteriorar el resto de las muestras de un paciente.
- *Proceso de tratamiento de las muestras de semen:* Se repitieron diversos protocolos para optimizar la concentración y exposición del material genético objeto del estudio.

3. Obtención de datos

También fueron varias las dificultades encontradas:

Medición de la proteína TRF1 en espermatozoides: En el caso de las muestras espermáticas, se realizó un intento con dos muestras que correspondían a dos varones normozoospermicos mayores de 40 años. Se eligió este grupo porque al tener los telómeros de los espermatozoides más largos, por ende, debería haber más proteína TRF1 protegiendo esos telómeros. Esto ayudaría a la detección de TRF1. Los individuos en particular se eligieron porque tenían mayor cantidad de esperma, por lo cual podíamos usar una parte para realizar experimentos sin terminar las muestras. Se comprobó la fluorescencia en un microscopio confocal pero no se advirtió ninguna señal en las muestras por lo que no se pudo adquirir imagen alguna en el microscopio. De este experimento concluimos que la inmunofluorescencia en espermatozoides es una técnica difícil debido al empaquetamiento de la cromatina, que habría que poner a punto para futuros estudios.

7

APLICACIONES



La posibilidad de disponer de biomarcadores que nos orienten sobre las posibilidades reproductivas de un individuo es de suma importancia. El gasto que suponen las técnicas de reproducción asistida y la implicación psicosocial de la infertilidad son las principales cuestiones a tener en cuenta en la persona o pareja que desea tener descendencia. En una segunda fase de este estudio se están correlacionando los hallazgos obtenidos con los resultados finales un tratamiento de reproducción, es decir tasas de fecundación, embarazo y recién nacido. Todo ello permitirá valorar la utilidad de la medición de LT o de otros elementos relacionados con el complejo telomérico como son las proteínas de la shelterina en la toma de decisiones en la práctica de la medicina reproductiva.

8

CONCLUSIONES



1. La ruta de los telómeros, que tiene implicaciones en envejecimiento, cáncer, homeostasis de los tejidos y la función de las células madre, también es importante para la fertilidad, concretamente en la aportación que hace el factor masculino.
2. Los telómeros de los espermatozoides, que son células muy especializadas con un fin muy determinado como es la reproducción, se alargan con la edad. Los espermatozoides producidos por hombres con seminograma OA no se alargan con la edad a niveles comparables con los controles, evidenciando que hay algún mecanismo de elongación telomérica que está fallando en hombres con la circunstancia OA.
3. Los espermatozoides de hombres mayores y con seminograma NZ poseen mayores niveles de telómeros muy largos, y menores niveles de telómeros muy cortos, que se han relacionado con la mala función de los tejidos y órganos, y desde el punto de vista molecular, con la senescencia celular y la apoptosis.
4. La longitud telomérica de los telómeros de la sangre de las personas con seminograma OA no están severamente alterados, aunque sí hay una tendencia a acumular mayor cantidad de telómeros cortos con la edad y menos cantidad de telómeros muy largos. De hecho, los niveles de daño en la cromatina presentes en las células sanguíneas son similares a los controles, como era de esperar dado que no había una acumulación masiva de telómeros cortos en las células sanguíneas de los hombres con seminogramas OA.
5. Los niveles de TRF1, que es una de las subunidades del complejo Shelterina encargado de la protección de los telómeros, son similares a los individuos control en todas las edades, aunque se encontró una ligera tendencia a tener menor protección en el caso de los individuos con seminograma OAZ, independientemente de su edad.

6. El RNA mensajero de TRF1 en sangre apareció expresado igualmente en todos los individuos analizados, pero en el esperma de los jóvenes con seminograma NZ se expresó en menor cantidad. Estos resultados son normales en el caso de los hombres del grupo de mayor edad con seminograma NZ, ya que presentan telómeros más largos, y, por tanto, deberían tener mayor protección. En el caso de los hombres con seminograma OAZ presentaron mayor expresión aun teniendo telómeros más cortos, lo cual sugiere que, o los mensajeros son menos estables y por ello es necesario tener más cantidad, o que las células está intentando proteger unos telómeros que de entrada no van a poder alargarse mucho, comparado con los controles.
7. En las células de la sangre se encontraron los mismos niveles de expresión de los genes correspondientes al componente de RNA y de la proteína de la enzima telomerasa, en todos los individuos analizados.
8. En las muestras de espermatozoides se encontraron los mismos niveles de expresión de los dos genes que dan lugar a la enzima telomerasa. Estos resultados sugieren que el defecto de alargamiento de los telómeros con la edad no se debe a la deficiencia de actividad telomerasa en las células madre adultas del tejido testicular, o si hay deficiencias en telomerasa en el tejido testicular, no están reflejados en el contenido de mensajero hallado en los espermatozoides.
9. Los hombres con seminograma OA tienen menor probabilidad de lograr embarazo bioquímico que los hombres control. También tienen menor probabilidad de lograr recién nacidos vivos y de tener éxito con un recién nacido vivo en el primer intento de transferencia de un embrión al útero.
10. A mayor longitud telomérica de los espermatozoides en personas con seminograma NZ hay mayores probabilidades de que los embriones fecundados con esos espermatozoides lleguen hasta el estadio de blastocisto.
11. A mayor acumulación de telómeros cortos en los espermatozoides, menor es la probabilidad de que los embriones se desarrollen hasta el estadio de blastocisto.
12. Mayores longitudes teloméricas de la sangre de personas con seminograma NZ implican mejores posibilidades de tener éxito en el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto.
13. La mayor proporción de telómeros largos en la sangre de personas con seminograma NZ, es indicativa de una mayor posibilidad de fecundación con éxito.
14. Todas las correlaciones de la longitud telomérica con los parámetros de fertilidad se pierden en el caso de personas con seminograma OA, indicando que hay otros factores que pueden estar afectando a la fertilidad de estas personas. Además, el hecho de tener telómeros en el esperma de menor tamaño que las personas con seminograma NZ no les confiere ventajas en cuanto a la reproducción.
15. La media de longitud telomérica en el esperma es un buen biomarcador de fertilidad masculina.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Naciones Unidas, Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo, editores. Informe de la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo: El Cairo, 5 a 13 de septiembre de 1994. Nueva York: Naciones Unidas; 1995.
2. Keramat A, Masoomi SZ, Mousavi SA, Poorolajal J, Shobeiri F, Hazavhei SMM. Quality of Life and Its Related Factors in Infertile Couples. *J Res Health Sci*. 2013;14(1):57-64.
3. Birnholz JC. Determination of Fetal Sex. *N Engl J Med*. 1983;309(16):942-4.
4. Wang N, Zhu W, Han B, Wang H, Zhu H, Chen Y, et al. Inherited Missense Mutation Occurring in Arginine76 of the SRY Gene Does Not Account for Familial 46, XY Sex Reversal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(5):1355-65.
5. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346(6281):240-4.
6. Singh V. *Textbook of Clinical Embryology*, 2nd Updated Edition, eBook. Elsevier Health Sciences; 2020. 387 p.
7. Rotgers E, Jørgensen A, Yao HH-C. At the Crossroads of Fate—Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad. *Endocr Rev*. 2018;21.
8. da Silva SM, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. 1996;14(1):62-8.
9. Christensen AK. A History of Leydig Cell Research. En: Payne AH, Hardy MP, editores. *The Leydig Cell in Health and Disease* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2007 [citado 15 de abril de 2021]. p. 3-30. (Contemporary Endocrinology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-453-7_1
10. Bouin P, Ancel P. Recherches sur les cellules interstitielles du testicule des mammiferes. *Arch Zool Exp Gen*. 1903;1:437-523.
11. Hall P, Irby D, Kretser D. Conversion of Cholesterol to Androgens by Rat Testes: Comparison of Interstitial Cells and Seminiferous Tubules. *Endocrinology*. 1969;84(3):488-96.
12. Silber S. Testis Development, Embryology, and Anatomy. En: Silber S, editor. *Fundamentals of Male Infertility* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 13 de septiembre de 2020]. p. 3-12. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76523-5_1
13. Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998;13(8):2122-5.
14. Schoor RA, Elhanbly SM, Niederberger C. The pathophysiology of varicocele-associated male infer-

tility. *Curr Urol Rep.* 2001;2(6):432-6.

15. Heyns CF. The gubernaculum during testicular descent in the human fetus. *J Anat.* 1987;153:93-112.

16. Patel N, Zafar Gondal A. Embryology, Mullerian-inhibiting Factor. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citado 15 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544351/>

17. Biasutto SN, Repetto E, Aliendo MM, Borghino VN. Inguinal canal development: the muscular wall and the role of the gubernaculum. *Clin Anat N Y N.* 2009;22(5):614-8.

18. Orts Llorca F. Anatomía humana. Tomo III. 6a ed. rev. por el autor y con adición de nuevas figuras. Barcelona: Editorial Científico-Médica; 1986. (Tomo III).

19. Testut L, Latarjet A. Tratado de anatomía humana. Tomo IV, Tomo IV,. Barcelona Ed. Salvat; 1988.

20. Roosen-Runge EC, Holstein AF. The human rete testis. *Cell Tissue Res.* 1978;189(3):409-33.

21. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas [Internet]. 12th ed. New York, NY: McGraw Hill Medical; 2009 [citado 18 de abril de 2021]. Disponible en: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2430>

22. Ergün S, Stingl J, Holstein AF. Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia.* 1994;26(5):255-62.

23. Weinbauer G, Luetjens C, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. En: *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction.* 3.a ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 11-60.

24. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat.* 1963;112(1):35-51.

25. Sousa M, Barros A, Takahashi K, Oliveira C, Silva J, Tesarik J. Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum Reprod.* 1999;14(5):1279-86.

26. Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *J Androl.* 2008;29(5):469-87.

27. Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction.* 2003;125(6):871-8.

28. Belleannée C, Thimon V, Sullivan R. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res.* 2012;349(3):717-31.

29. Breton S, Ruan YC, Park Y-J, Kim B. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian J Androl.* 2016;18(1):3-9.

30. Shum WC, Ruan YC, Da Silva N, Breton S. Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis:

Control of Luminal Acidification. *J Androl.* 2011;32(6):576-86.

31. Cooper TG. Recent advances in sperm maturation in the human epididymis. *Andrologie.* 2002;12(1):38-51.

32. Chakrabarti R, Cheng L, Puri P, Soler D, Vijayaraghavan S. Protein phosphatase PP1 β in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. *Asian J Androl.* 2007;9(4):445-52.

33. Castillo J, Bogle OA, Jodar M, Torabi F, Delgado-Dueñas D, Estanyol JM, et al. Proteomic Changes in Human Sperm During Sequential in vitro Capacitation and Acrosome Reaction. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 20 de noviembre de 2019 [citado 13 de septiembre de 2020];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6879431/>

34. Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(4):1219-23.

35. Ito C, Toshimori K. Acrosome markers of human sperm. *Anat Sci Int.* 2016;91(2):128-42.

36. Bernecic NC, Gadella BM, Leahy T, de Graaf SP. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology.* 2019;137:56-66.

37. Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology.* 1992;130(5):2978-84.

38. Courot M. Hormonal Regulation of Male Reproduction (with Reference to Infertility in Man). *Andrologia.* 1976;8(3):187-93.

39. Ying S-Y. Inhibins, Activins, and Follistatins: Gonadal Proteins Modulating the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocr Rev.* 1988;9(2):267-93.

40. McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNeilly JR. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Camb Engl Suppl.* 2003;61:463-76.

41. Zegers-Hochschild F, Nygren K-G, Adamson GD, Mouzon J de, Lancaster P, Mansour R, et al. The International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) glossary on ART terminology. *Fertil Steril.* 2006;86(1):16-9.

42. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1520-4.

43. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Glosario de Terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring

- Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la salud (OMS). *JBRA Assist Reprod.* 2010;14(2):19-23.
44. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017;32(9):1786-801.
45. World Health Organization, editor. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p.
46. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016;5(6):935-50.
47. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):605-21.
48. Rutsein S, Shah I. WHO | Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. Demographic and Health Surveys (DHS) Comparative reports No. 9 [Internet]. WHO. World Health Organization; 2004 [citado 14 de septiembre de 2020]. Disponible en: https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/DHS_9/en/
49. Matorras J, Coroleu B, Romeu A, Pérez A. Libro blanco sociosanitario la infertilidad en España: situación actual y perspectivas. Matorras J, editor. Las Matas, Madrid: Imago Concept & Image Development; 2011. 315-329 p.
50. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.* 2002;77(5):873-82.
51. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol RBE* [Internet]. 2015 [citado 15 de septiembre de 2020];13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424520/>
52. Leung AK, Henry MA, Mehta A. Gaps in male infertility health services research. *Transl Androl Urol.* 2018;7(Suppl 3):S303-9.
53. Hanson BM, Hotaling JM. Limitations and opportunities in male fertility databases. *Transl Androl Urol.* 2018;7(Suppl 3):S292-302.
54. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 2012;62(2):324-32.
55. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained Male infertility: diagnosis and Management. *Int Braz J Urol.* 2012;38(5):576-94.
56. Carrell DT, Aston KI, Oliva R, Emery BR, De Jonge CJ. The "omics" of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell Tissue Res.* 2016;363(1):295-312.

57. Tournaye H. Management of male infertility by assisted reproductive technologies. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000;14(3):423-35.
58. Tournaye HJ, Cohlen BJ. Management of male-factor infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(6):769-75.
59. Murshidi MM, Choy JT, Eisenberg ML. Male Infertility and Somatic Health. *Urol Clin North Am.* 2020;47(2):211-7.
60. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research* [Internet]. 2019 [citado 18 de abril de 2021];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524745/>
61. Holoch P, Wald M. Current options for preservation of fertility in the male. *Fertil Steril.* 2011;96(2):286-90.
62. Giwerc A, Chebbi A, Dupuis H, Chiavelli H, Cornu J-N, Pfister C, et al. Onco-TESE et cancer du testicule. *Prog En Urol.* 2021;31(5):293-302.
63. Pelzman DL, Orwig KE, Hwang K. Progress in translational reproductive science: testicular tissue transplantation and in vitro spermatogenesis. *Fertil Steril.* 2020;113(3):500-9.
64. Zarandi NP, Galdon G, Kogan S, Atala A, Sadri-Ardekani H. Cryostorage of immature and mature human testis tissue to preserve spermatogonial stem cells (SSCs): a systematic review of current experiences toward clinical applications. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2018;Volume 11:23-38.
65. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11298-302.
66. Nagano M, Ryu B-Y, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of Mouse Male Germ Line Stem Cells In Vitro. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2207-14.
67. Holoch P, Wald M. Current options for preservation of fertility in the male. *Fertil Steril.* 2011;96(2):286-90.
68. Huleihel M, Lunenfeld E. Approaches and Technologies in Male Fertility Preservation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15).
69. Honaramooz A, Megee SO, Rathi R, Dobrinski I. Building a Testis: Formation of Functional Testis Tissue after Transplantation of Isolated Porcine (*Sus scrofa*) Testis Cells. *Biol Reprod.* 2007;76(1):43-7.
70. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature.* 2011;471(7339):504-7.
71. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fi-

- broblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
72. Irie N, Surani MA. Efficient Induction and Isolation of Human Primordial Germ Cell-Like Cells from Competent Human Pluripotent Stem Cells. En: Buszczak M, editor. *Germline Stem Cells* [Internet]. New York, NY: Springer; 2017 [citado 18 de abril de 2021]. p. 217-26. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4017-2_16
73. Zakian VA. Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Exp Cell Res*. 2012;318(12):1456-60.
74. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622-6.
75. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*. 1999;97(4):503-14.
76. Lange T de. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-10.
77. Pérez M del R, Dubner D, Michelín S, Gisone P, Carosella E. Telomeres and genomic damage repair. Their implication in human pathology. *Medicina (Mex)*. 2002;62(6):593-603.
78. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet*. 2018;52(1):223-47.
79. Chong L, Steensel B van, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, et al. A Human Telomeric Protein. *Science*. 1995;270(5242):1663-7.
80. Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J*. 1997;16(7):1785-94.
81. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, et al. Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell*. 2009;138(1):90-103.
82. Martínez P, Thanasoula M, Muñoz P, Liao C, Tejera A, McNees C, et al. Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev*. 2009;23(17):2060-75.
83. Karlseder J, Kachatrian L, Takai H, Mercer K, Hingorani S, Jacks T, et al. Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(18):6533-41.
84. Schneider RP, Garrobo I, Foronda M, Palacios JA, Marión RM, Flores I, et al. TRF1 is a stem cell marker and is essential for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2013;4(1):1946.
85. Derevyanko A, Whittmore K, Schneider RP, Jiménez V, Bosch F, Blasco MA. Gene therapy with the

TRF1 telomere gene rescues decreased TRF1 levels with aging and prolongs mouse health span. *Aging Cell*. 2017;16(6):1353-68.

86. Gedvilaite G, Vilkeviciute A, Kriauciuniene L, Banevičius M, Liutkeviciene R. The relationship between leukocyte telomere length and TERT, TRF1 single nucleotide polymorphisms in healthy people of different age groups. *Biogerontology*. 2020;21(1):57-67.

87. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.

88. Olovnikov AM. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971;201(6):1496-9.

89. Chatterjee S. Telomeres in health and disease. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2017;21(1):87-91.

90. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.

91. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987;51(6):887-98.

92. Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2011;366(1561):76-84.

93. Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8034-8.

94. Varela E, Schneider RP, Ortega S, Blasco MA. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15207-12.

95. Varela E, Muñoz-Lorente MA, Tejera AM, Ortega S, Blasco MA. Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat Commun [Internet]*. 2016 [citado 5 de enero de 2018];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4895768/>

96. Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science*. 1995;269(5228):1267-70.

97. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 2002;69(4):188-97.

98. Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng N. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):5147-52.

99. Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA. The longest telomeres: a general signa-

- ture of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 2008;22(5):654-67.
100. Martínez P, Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Biol.* 2017;216(4):875-87.
101. Yui J, Chiu C-P, Lansdorp PM. Telomerase Activity in Candidate Stem Cells From Fetal Liver and Adult Bone Marrow. *Blood.* 1998;91(9):3255-62.
102. Kyo S, Kunimi K, Uchibayashi T, Namiki M, Inoue M. Telomerase Activity in Human Urothelial Tumors. *Am J Clin Pathol.* 1997;107(5):555-60.
103. Zhu H, Belcher M, van der Harst P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin Sci Lond Engl 1979.* 2011;120(Pt 10):427-40.
104. Vera E, Bernardes de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals. *Cell Rep.* 2012;2(4):732-7.
105. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):693-704.
106. Alder JK, Chen JJ-L, Lancaster L, Danoff S, Su S, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13051-6.
107. Balc'h EL, Grandin N, Demattei M-V, Guyétant S, Tallet A, Pagès J-C, et al. Measurement of Telomere Length in Colorectal Cancers for Improved Molecular Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1871.
108. Blackburn EH. Switching and Signaling at the Telomere. *Cell.* 2001;106(6):661-73.
109. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene.* 2002;21(4):564-79.
110. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18(2):173-9.
111. Zalenskaya IA, Zalensky AO. Telomeres in mammalian male germline cells. *Int Rev Cytol.* 2002;218:37-67.
112. Damjanovic AK, Yang Y, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Nguyen H, Laskowski B, et al. Accelerated Telomere Erosion Is Associated with a Declining Immune Function of Caregivers of Alzheimer's Disease Patients. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;179(6):4249-54.
113. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, et al. Leukocyte Telomere Length in Major Depression: Correlations with Chronicity, Inflammation and Oxidative Stress - Preliminary Findings. *PLoS ONE [Internet].* 2011 [citado 17 de septiembre de 2020];6(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063175/>
114. Sibille KT, Witek-Janusek L, Mathews HL, Fillingim RB. Telomeres and epigenetics: Potential relevance to chronic pain. *Pain.* 2012;153(9):1789-93.

115. Loprinzi PD, Loenneke JP, Blackburn EH. Movement-Based Behaviors and Leukocyte Telomere Length among US Adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(11):2347-52.
116. Marti A. Telómeros y calidad de la dieta: Una revisión sistemática. *Nutr Hosp* [Internet]. 14 de septiembre de 2017 [citado 17 de septiembre de 2020]; Disponible en: <http://revista.nutricionhospitalaria.net/index.php/nh/article/view/1181>
117. Cooke HJ, Smith BA. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:213-9.
118. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(21):10114-8.
119. Jørgensen PB, Fedder J, Koelvraa S, Graakjaer J. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man. *Maturitas.* 2013;75(4):380-5.
120. Antunes DMF, Kalmbach KH, Wang F, Dracxler RC, Seth-Smith ML, Kramer Y, et al. A single-cell assay for telomere DNA content shows increasing telomere length heterogeneity, as well as increasing mean telomere length in human spermatozoa with advancing age. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(11):1685-90.
121. Stindl R. Is telomere erosion a mechanism of species extinction? *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol.* 2004;302(2):111-20.
122. Stindl R. The telomeric sync model of speciation: species-wide telomere erosion triggers cycles of transposon-mediated genomic rearrangements, which underlie the saltatory appearance of nonadaptive characters. *Naturwissenschaften.* 2014;101(3):163-86.
123. Stindl R. The paradox of longer sperm telomeres in older men's testes: a birth-cohort effect caused by transgenerational telomere erosion in the female germline. *Mol Cytogenet.* 2016;9:12.
124. Unryn BM, Cook LS, Riabowol KT. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell.* 2005;4(2):97-101.
125. Hjelmberg JB, Dalgård C, Mangino M, Spector TD, Halekoh U, Möller S, et al. Paternal age and telomere length in twins: the germ stem cell selection paradigm. *Aging Cell.* 2015;14(4):701-3.
126. Arbeev KG, Hunt SC, Kimura M, Aviv A, Yashin AI. Leukocyte Telomere Length, Breast Cancer Risk in the Offspring: The Relations with Father's Age at Birth. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(4):149-53.
127. Kalmbach KH, Antunes DMF, Kohlrausch F, Keefe DL. Telomeres and Female Reproductive Aging. *Semin Reprod Med.* 2015;33(6):389-95.
128. Eisenberg DTA, Tackney J, Cawthon RM, Cloutier CT, Hawkes K. Paternal and grandpaternal ages at conception and descendant telomere lengths in chimpanzees and humans. *Am J Phys Anthropol.* 2017;162(2):201-7.

129. Ferlin A, Rampazzo E, Rocca MS, Keppel S, Frigo AC, De Rossi A, et al. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod.* 2013;28(12):3370-6.
130. Frutos C de, López-Cardona AP, Balvís NF, Laguna-Barraza R, Rizos D, Gutierrez-Adán A, et al. Spermatozoa telomeres determine telomere length in early embryos and offspring. *Reproduction.* 2016;151(1):1-7.
131. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol.* 2014;51:15-27.
132. Liu M, Maselli J, Hales BF, Robaire B. The effects of chemotherapy with bleomycin, etoposide, and cis-platinum on telomeres in rat male germ cells. *Andrology.* 2015;3(6):1104-12.
133. Thilagavathi J, Kumar M, Mishra SS, Venkatesh S, Kumar R, Dada R. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;287(4):803-7.
134. Reig-Viader R, Capilla L, Vila-Cejudo M, Garcia F, Anguita B, Garcia-Caldés M, et al. Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertil Steril.* 2014;102(3):728-738.e1.
135. Lafuente R, Bosch-Rue E, Ribas-Maynou J, Alvarez J, Brassesco C, Amengual MJ, et al. Sperm telomere length in motile sperm selection techniques: A qFISH approach. *Andrologia.* 2018;50(2):e12840
136. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, Alviggi C, Pivonello R, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online.* 2016;33(3):404-11.
137. Rocca MS, Speltra E, Menegazzo M, Garolla A, Foresta C, Ferlin A. Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Hum Reprod.* 2016;31(6):1158-63.
138. Yang Q, Zhao F, Dai S, Zhang N, Zhao W, Bai R, et al. Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development. *Hum Reprod.* 2015;30(8):1876-81.
139. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol RBE [Internet].* 2015 [citado 1 de octubre de 2017];13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455614/>
140. Zhao F, Yang Q, Shi S, Luo X, Sun Y. Semen preparation methods and sperm telomere length: density gradient centrifugation versus the swim up procedure. *Sci Rep [Internet].* 2016 [citado 1 de octubre de 2017];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5153621/>
141. Sabanegh E, Agarwal A, Wein A. Male infertility. En: *Campbell-Walsh Urology [Internet].* 10th ed. Philadelphia PA, USA:Saunders: Wein AJ, Kavaoussi LR, Novick AC; 2012 [citado 20 de junio de 2021].

- p. 616-47. Disponible en: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Campbell-Walsh+Urology&author=E+Sabanegh&author=A+Agarwal&publication_year=2012&
142. Müezziner A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev.* 2013;12(2):509-19.
143. Whittemore K, Vera E, Martínez-Nevaldo E, Sanpera C, Blasco MA. Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(30):15122-7.
144. Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.* 2010;459(2):259-68.
145. Epel E. How «reversible» is telomeric aging? *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2012;5(10):1163-8.
146. Martens DS, Nawrot TS. Ageing at the level of telomeres in association to residential landscape and air pollution at home and work: a review of the current evidence. *Toxicol Lett.* 2018;298:42-52.
147. Reichert S, Stier A. Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. *Biol Lett.* 2017;13(12):20170463.
148. Dugdale HL, Richardson DS. Heritability of telomere variation: it is all about the environment! *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1741):20160450.
149. Njajou OT, Hsueh W-C, Blackburn EH, Newman AB, Wu S-H, Li R, et al. Association Between Telomere Length, Specific Causes of Death, and Years of Healthy Life in Health, Aging, and Body Composition, a Population-Based Cohort Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;64A(8):860-4.
150. Cas AD, Spigoni V, Franzini L, Preti M, Ardigò D, Derlindati E, et al. Lower endothelial progenitor cell number, family history of cardiovascular disease and reduced HDL-cholesterol levels are associated with shorter leukocyte telomere length in healthy young adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(3):272-8.
151. Bhupatiraju C, Saini D, Patkar S, Deepak P, Das B, Padma T. Association of shorter telomere length with essential hypertension in Indian population. *Am J Hum Biol.* 2012;24(4):573-8.
152. Yang Z, Huang X, Jiang H, Zhang Y, Liu H, Qin C, et al. Short Telomeres and Prognosis of Hypertension in a Chinese Population. *Hypertension.* 2009;53(4):639-45.
153. Kark JD, Nassar H, Shaham D, Sinnreich R, Goldberger N, Aboudi V, et al. Leukocyte telomere length and coronary artery calcification in Palestinians. *Atherosclerosis.* 2013;229(2):363-8.
154. Willeit P, Willeit J, Brandstätter A, Ehrlenbach S, Mayr A, Gasperi A, et al. Cellular Aging Reflected by Leukocyte Telomere Length Predicts Advanced Atherosclerosis and Cardiovascular Disease Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1649-56.

155. Zhang W, Chen Y, Wang Y, Liu P, Zhang M, Zhang C, et al. Short telomere length in blood leucocytes contributes to the presence of atherothrombotic stroke and haemorrhagic stroke and risk of post-stroke death. *Clin Sci*. 2013;125(1):27-43.
156. Fyhrquist F, Silventoinen K, Saijonmaa O, Kontula K, Devereux RB, de Faire U, et al. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *J Hum Hypertens*. 2011;25(12):711-8.
157. Wang Y-Y, Chen A-F, Wang H-Z, Xie L-Y, Sui K-X, Zhang Q-Y. Association of shorter mean telomere length with large artery stiffness in patients with coronary heart disease. *Aging Male*. 2011;14(1):27-32.
158. Zee RY, Michaud SE, Germer S, Ridker PM. Association of Shorter Mean Telomere Length with Risk of Incident Myocardial Infarction: A Prospective, Nested Case-Control Approach. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2009;403(1-2):139-41.
159. Perez-Rivera J-A, Pabon-Osuna P, Cieza-Borrella C, Martin-Herrero F, Gonzalez-Porras J-R, Gonzalez-Sarmiento R. Prognostic value of telomere length in acute coronary syndrome. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(11):695-7.
160. Houben JMJ, Giltay EJ, Rius-Ottenheim N, Hageman GJ, Kromhout D. Telomere Length and Mortality in Elderly Men: The Zutphen Elderly Study. *J Gerontol Ser A*. 2011;66A(1):38-44.
161. Maxwell F, McGlynn LM, Muir HC, Talwar D, Benzeval M, Robertson T, et al. Telomere Attrition and Decreased Fetuin-A Levels Indicate Accelerated Biological Aging and Are Implicated in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5573-81.
162. Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Crook JE, Thomas CS, Johnson RA, Roberts ME. Shorter peripheral blood telomeres are a potential biomarker for patients with advanced colorectal adenomas. *Int J Biol Markers* [Internet]. 2012 [citado 29 de mayo de 2021];27(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3841073/>
163. Mirabello L, Garcia-Closas M, Cawthon R, Lissowska J, Brinton LA, Peptońska B, et al. Leukocyte telomere length in a population-based case-control study of ovarian cancer: a pilot study. *Cancer Causes Control CCC*. 2010;21(1):77-82.
164. Hou L, Savage SA, Blaser MJ, Perez-Perez G, Hoxha M, Dioni L, et al. Telomere Length in Peripheral Leukocyte DNA and Gastric Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2009;18(11):3103-9.
165. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*. 2010;304(1):69-75.
166. Shen Q, Zhao X, Yu L, Zhang Z, Zhou D, Kan M, et al. Association of Leukocyte Telomere Length with

- Type 2 Diabetes in Mainland Chinese Populations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):1371-4.
167. Monickaraj F, Aravind S, Gokulakrishnan K, Sathishkumar C, Prabu P, Prabu D, et al. Accelerated aging as evidenced by increased telomere shortening and mitochondrial DNA depletion in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1):343-50.
168. Harte AL, da Silva NF, Miller MA, Cappuccio FP, Kelly A, O'Hare JP, et al. Telomere Length Attrition, a Marker of Biological Senescence, Is Inversely Correlated with Triglycerides and Cholesterol in South Asian Males with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Diabetes Res [Internet]*. [citado 29 de mayo de 2021];2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303685/>
169. Testa R, Olivieri F, Sirolla C, Spazzafumo L, Rippon MR, Marra M, et al. Leukocyte telomere length is associated with complications of type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2011;28(11):1388-94.
170. Lansdorp PM. Major cutbacks at chromosome ends. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(7):388-95.
171. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng N. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):699-706.
172. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9857-60.
173. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet.* 2004;36(5):447-9.
174. Robinson LG, Pimentel R, Wang F, Kramer YG, Gonullu DC, Agarwal S, et al. Impaired reproductive function and fertility preservation in a woman with a dyskeratosis congenita. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(5):1221-5.
175. Benetos A, Toupance S, Gautier S, Labat C, Kimura M, Rossi PM, et al. Short Leukocyte Telomere Length Precedes Clinical Expression of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018;122(4):616-23.
176. Llorca-Cardenosa MJ, Peña-Chilet M, Mayor M, Gomez-Fernandez C, Casado B, Martin-Gonzalez M, et al. Long telomere length and a TERT-CLPTM1 locus polymorphism association with melanoma risk. *Eur J Cancer.* 2014;50(18):3168-77.
177. Hotaling JM, Laufer N, Rosenwaks Z. Introduction: Cancer biomarkers and fertility. *Fertil Steril.* 2018;109(1):4-5.
178. Hanson BM, Eisenberg ML, Hotaling JM. Male infertility: a biomarker of individual and familial cancer risk. *Fertil Steril.* 2018;109(1):6-19.
179. Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.*

2000;1(1):40-7.

180. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations, father's age, and disease risk. *Nature*. 2012;488(7412):471-5.

181. Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmborg JB, Brimacombe M, et al. Offspring's Leukocyte Telomere Length, Paternal Age, and Telomere Elongation in Sperm. *PLoS Genet* [Internet]. 2008 [citado 30 de mayo de 2021];4(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2242810/>

182. Aston KI, Hunt SC, Susser E, Kimura M, Factor-Litvak P, Carrell D, et al. Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans. *Mol Hum Reprod*. 2012;18(11):517-22.

183. Berneau SC, Shackleton J, Nevin C, Altakroni B, Papadopoulos G, Horne G, et al. Associations of sperm telomere length with semen parameters, clinical outcomes and lifestyle factors in human normozoospermic samples. *Andrology*. 2020;8(3):583-93.

184. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*. 2003;33(2):203-7.

185. Graakjaer J, Der-Sarkissian H, Schmitz A, Bayer J, Thomas G, Kolvraa S, et al. Allele-specific relative telomere lengths are inherited. *Hum Genet*. 2006;119(3):344-50.

186. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, et al. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet*. 2007;16(24):3097-102.

187. Eisenberg DTA. Inconsistent inheritance of telomere length (TL): is offspring TL more strongly correlated with maternal or paternal TL? *Eur J Hum Genet*. 2014;22(1):8-9.

188. De Meyer T, Vandepitte K, Denil S, De Buyzere ML, Rietzschel ER, Bekaert S. A non-genetic, epigenetic-like mechanism of telomere length inheritance? *Eur J Hum Genet*. 2014;22(1):10-1.

189. De Meyer T, Eisenberg DTA. Possible technical and biological explanations for the 'parental telomere length inheritance discrepancy' enigma. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(1):3-4.

190. Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K, McKeague I, Kark JD, Hoffman M, et al. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics* [Internet]. 2016 [citado 31 de mayo de 2021];137(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811318/>

191. Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, et al. Meta-analysis of telomere length in 19 713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(10):1163-8.

192. Olsson M, Pauliny A, Wapstra E, Uller T, Schwartz T, Blomqvist D. Sex Differences in Sand Lizard Telomere Inheritance: Paternal Epigenetic Effects Increases Telomere Heritability and Offspring Survival. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [citado 5 de junio de 2021];6(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081292/>
193. Asghar M, Bensch S, Tarka M, Hansson B, Hasselquist D. Maternal and genetic factors determine early life telomere length. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2015 [citado 5 de junio de 2021];282(1799). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286038/>
194. Horn T, Robertson BC, Will M, Eason DK, Elliott GP, Gemmell NJ. Inheritance of Telomere Length in a Bird. *PLoS ONE* [Internet]. 22 de febrero de 2011 [citado 5 de junio de 2021];6(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043093/>
195. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*. 1996;2(8):613-9.
196. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001;75(4):674-7.
197. Shen H-M, Ong C-N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(4):529-36.
198. Biron-Shental T, Wisner A, Hershko-Klement A, Markovitch O, Amiel A, Berkovitch A. Sub-fertile sperm cells exemplify telomere dysfunction. *J Assist Reprod Genet*. 2017;1-6.
199. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet*. 1997;17(2):236-9.
200. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*. 1997;17(2):231-5.
201. Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep*. 2005;6(1):39-45.
202. Ancelin K, Brunori M, Bauwens S, Koering C-E, Brun C, Ricoul M, et al. Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: Evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol*. 2002;22(10):3474-87.
203. Smogorzewska A, Van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*. 2000;20(5):1659-68.
204. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*. 1997;385(6618):740-3.

205. Canudas S, Smith S. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol.* 2009;187(2):165-73.
206. Nakamura M, Zhou XZ, Kishi S, Kosugi I, Tsutsui Y, Lu KP. A specific interaction between the telomeric protein Pin2/TRF1 and the mitotic spindle. *Curr Biol.* 2001;11(19):1512-6.
207. McKerlie M, Zhu X-D. Cyclin B-dependent kinase 1 regulates human TRF1 to modulate the resolution of sister telomeres. *Nat Commun.* 2011;2(1):371.
208. Dynek JN, Smith S. Resolution of Sister Telomere Association Is Required for Progression Through Mitosis. *Science.* 2004;304(5667):97-100.
209. Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess A-N. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(11):669-78.
210. Keefe DL. Telomeres and genomic instability during early development. *Eur J Med Genet.* 2020;63(2):103638.
211. Scherthan H. Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(2):117-24.
212. van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AAHA, van der Vlag J, et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol.* 2008;8:34.
213. Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin Structure of Telomere Domain in Human Sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(1):213-8.
214. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20662-6.
215. Hales BF, Grenier L, Lalancette C, Robaire B. Epigenetic programming: From gametes to blastocyst. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011;91(8):652-65.
216. Darmishonnejad Z, Zarei-Kheirabadi F, Tavalae M, Zarei-Kheirabadi M, Zohrabi D, Nasr-Esfahani MH. Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia.* 2020;52(5):e13546.
217. Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K, Han M, et al. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol.* 2012;198(2):165-72.

10

ANEXOS



1. CI para pacientes del estudio

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

(a rellenar por el paciente)

Para obtención de muestra biológica para ANÁLISIS SANGRE y MUESTRA DE SEMEN

Código:

Yo

con Nº de Historia

COPIA PARA EL PACIENTE - COPIA PARA EL PACIENTE

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con:

Investigador/Médico del centro

Quien me ha explicado los detalles del mismo, en particular de:

1. La finalidad de la investigación o de la línea de investigación para la que consiento
2. Los beneficios esperados con la misma
3. De los posibles inconvenientes vinculados a la donación y obtención de la muestra, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.
4. De la identidad del responsable de esta investigación Dr.:

Investigador/Médico del centro

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Los análisis genéticos a realizar se limitarán estrictamente a los reflejados en el contenido del proyecto de investigación y que consistirán en el estudio de longitud de telómeros, telomerasa y shelterinas en espermatozoides y leucocitos, para ser relacionadas con la condición de edad y anomalías en los parámetros seminales.

Los datos genéticos de carácter personal se conservarán durante un período mínimo de cinco años desde la fecha en que fueron obtenidos, transcurrido el cual el interesado podrá solicitar su cancelación. En el caso de que no se solicite la cancelación, los datos se conservarán durante el plazo que sea necesario para preservar la salud de la persona de quien proceden o de terceros relacionados con ella.



Todos los datos recogidos para el estudio, serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo el investigador principal podrá relacionar dichos datos con usted.

Usted tiene derecho, de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica, a solicitar acceso a la información genética obtenida de sus muestras en este estudio a través del investigador principal. No obstante, debe saber que las investigaciones que se van a realizar con sus muestras, por el momento no tienen significado clínico. Es de esperar, que en el futuro y como resultado de ésta y otras investigaciones, la información obtenida con sus muestras ayude a tomar decisiones en este contexto clínico. En caso de que se produjeran hallazgos en estas pruebas genéticas que pudieran tener relevancia para usted o para su familia se le suministrará consejo genético.

Las muestras biológicas serán conservadas a -80°C en los laboratorios de la clínica correspondiente al lugar de su obtención para su custodia y análisis.

Firma del paciente

Firma del investigador

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

COPIA PARA EL PACIENTE - COPIA PARA EL PACIENTE



2. Autorización de CEIC Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid



D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID

CERTIFICA

Que en la reunión del CEIm del 9 de julio de 2018 (Acta nº 13.18), ha sido evaluada la enmienda relevante del proyecto de investigación titulado: *La biología de los telómeros en el envejecimiento y su relación con los parámetros seminales* (1711-MAD-109-CB), del que es investigador principal el Dr. Carlos Balmori Boticario del Servicio de Urología de IVIRMA Madrid, considerándose:

Se considera que su planteamiento global es correcto desde el punto de vista metodológico y ético.

Documentos Modificados:

- Protocolo Versión 2 del 29 de Junio de 2018.
- Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado Versión 2 del 29 de Junio de 2018.

En Majadahonda, a 9 de julio de 2018

Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda
SaludMadrid
Comunidad de Madrid
Comité Ético de Investigación Clínica

Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Presidenta del CEIm

ZONA NOROESTE
C/ Joaquín Rodrigo, 2
28222 Majadahonda / Madrid
Tel.: 91 191 60 00
Fax: 91 373 05 35



3. Primer artículo publicado sobre la temática de la tesis

REVIEW



Should we consider telomere length and telomerase activity in male factor infertility?

Carlos Balmori^{a,b} and Elisa Varela^{b,c}

Purpose of review

The purpose of this review is to analyze what is known to date about the relation between telomeres and male fertility, and if it is possible for telomeres, or elements related to them, to be used as new prognostic biomarkers in fertility treatment.

Recent findings

Cells in germ series, including spermatozooids, have longer telomeres (10–20 kb), and do not seem to undergo the shortening that takes place in somatic cells with age as they present telomerase activity. Longer telomere length found in the sperm of older fathers, influences their offspring possessing cells with longer telomere length. Infertile patients have spermatozooids with shorter telomere length than fertile people, but telomere length does neither correlate with the sperm concentration, mobility or morphology, nor with the DNA fragmentation indices (DFI) of spermatozooids. Embryo quality rate and transplantable embryo rate are related with the telomere length of spermatozooids (STL), but pregnancy rates are not affected.

Summary

Telomere length and telomerase levels can be used as biomarkers of male fertility. Higher STL can have beneficial effects on fertility, thus the use of spermatozooids with longer telomere length in an assisted reproduction technique (ART) could be one way of solving some infertility cases.

Keywords

male infertility, sperm telomere length, telomerase

INTRODUCTION

Between 8 and 12% of couples have fertility problems. The male factor as the origin of infertility is present in 40–50% of these couples [1]. The worldwide percentage of infertile men is estimated to lie between 2.5 and 12% [2].

The causes of male infertility are not known in as many as 30% of cases according to the European Urology Association Guidelines [3]. However, Punab and coworkers in 2017 have found clear differences between severe male infertility cases, such as azoospermia, aspermia or cryptozoospermia, where it is possible to evidence its origin most of the time. In the cases of oligozoospermia, representing 86% of all infertilities, the molecular origin of this cause is highly unknown [4]. Bearing in mind this high percentage of idiopathic male infertility, it is necessary to seek beyond basic anatomical, infectious, endocrine, metabolic or genetic problems, to explore other research fields, including the so-called ‘omics.’ The genomics, epigenomics, transcriptomics and proteomics of spermatogenesis can provide data that may be used for the diagnosis, prognosis and treatment of male infertility [5].

However, recent studies have indicated other molecular mechanisms as causes of infertility, which have to do with telomere biology [6,7]. Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of chromosomes. In humans, telomeres consist of tandem repeats of a DNA sequence rich in Guanine (G) bases, in the following sequence ‘TTAGGG,’ of about 10–15 kb long [8]. In mouse, telomeres are about 40–50 kb long, but the rate of telomere shortening is different for each species. Whereas in humans, telomeres shorten at a rate of 60–70 bp per year, mouse telomeres shorten 100 times faster [9,10]. Telomeres end in a 3’ single stranded overhang that is able to form telomere loops, a structure that contributes to telomere protection [11,12] (Fig. 1). Despite telomere protection,

^aURJC (Rey Juan Carlos University), ^bIVI RMA, Madrid and ^cIdIPaz, Calle de Pedro Rico, Madrid, Spain

Correspondence to Elisa Varela, IVI RMA, Madrid, Av del Talgo, 68, 28023 Madrid, Spain. Tel: +34 911802900; e-mail: MariaElisa.Varela@ivirma.com

Curr Opin Obstet Gynecol 2018, 30:197–202

DOI:10.1097/GCO.0000000000000451

Fertility, IVF and reproductive genetics

KEY POINTS

- Telomeres are specialized structures that cap the ends of chromosomes and help to maintain genomic integrity and stability.
- Genetic factors, such as lifestyle and psychological stress play a crucial role in modulating telomere length.
- Telomeres length and telomerase levels could be used as biomarkers of male fertility.

because of the unidirectional nature of the replication machinery, telomeres shorten whenever cells divide [13], promoting organismal aging or cancer [14,15].

Through the expression of an enzyme called telomerase, telomere shortening can be reversed, because telomerase is able to add de novo repeats onto chromosome ends [16]. Telomerase is activated during embryogenesis at the blastocyst stage, at which the longest telomeres are found [17,18], localizing to inner cell mass [18,19]. As cells differentiate, telomerase is inactivated, which implies the start of telomere shortening [20,21]. Telomerase remains inactive in most cells of an adult organism, which are postmitotic, but remains active in adult stem cells, germ cells, in most tumors and also in embryonic stem cells [22]. Stem and tumor cells display high telomerase activity [23,24].

In adult human tissue with a high regenerative potential, such as bone marrow, skin and the gastrointestinal tract, telomerase activity continues to be moderately expressed in the stem-cell niches [21] and in activated lymphocytes [25].

Sperm telomere length increases with age but the consequences of excessive telomere lengthening for human reproduction and the offspring are only recently being started to be studied. The review will focus on these topics.

TELOMERES AND CELLULAR HOMEOSTASIS

Cell division is the mechanism by which organs grow, develop and maintain their tissues. However, the 'Hayflick limit' determines that these divisions are finite (roughly 50 divisions), after which cells enter senescence or apoptosis [26]. The so-called 'DNA end-replication problem,' as described by Olovnikov [13], explains the Hayflick limit phenomenon that happens in the linear chromosomes of the eukaryotic organisms where their ends are not replicated. This leads to gradual telomeric DNA shortening until a critically short length is reached, which activates response signals to DNA damage (DDR) and causes senescence or cell death [27]. Thus, age and other factors, like the action of nucleases or exposure to free oxygen radicals (ROS), would lead to telomere shortening which, below a critical length, would eliminate the protective capacity of telomeres. Therefore, telomere attrition leads to fusions between chromosome ends, stop the cell cycle, genome destabilization and finally, evolve to deteriorated and aged tissues [14,28^{*}]. If several telomeres of the same cell have critically short length, then the cell enters in crisis and may reactivate telomerase and become cancerous [29,30^{**}].

Telomeres have a stabilizing effect on the genome whenever there are genetic aggressions through the repair of telomere lesions. Numerous

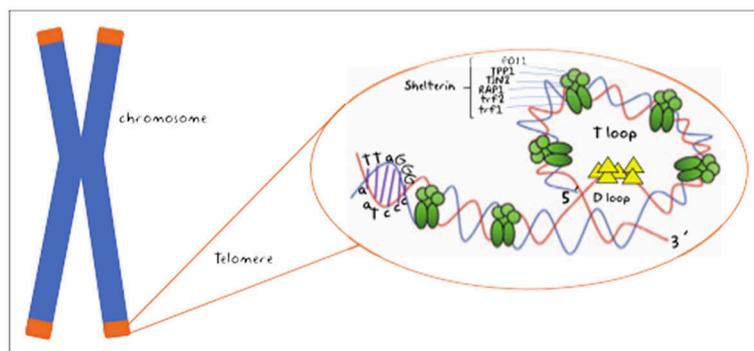


FIGURE 1. Telomere DNA contains double-stranded tandem repeats of TTAGGG followed by terminal 3' G-rich single-stranded overhangs. Telomere DNA is thought to adopt the T-loop structure, where the telomere end folds back on itself and the 3' G strand overhang invades into the double-stranded DNA called D-loop. Shelterin complex is composed of six polypeptides: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 and POT1. Shelterin regulates the telomerase-mediated maintenance of the telomeric DNA and protects telomeres from DNA damage signaling and DNA repair.

proteins involved directly or indirectly in the detection and repair of DNA damage, such as ATM, DNA-PK complex or RAD50-MRE11-NBS1 complex are in close association with the telomeres [31], indicating that telomeres act as a reservoir of proteins that can repair specific damage at telomeres [31].

It is well known that telomere length shortens in different somatic cells with age, which becomes more accentuated in different disease types, like arteriosclerosis, hypertension, diabetes and Parkinson's or Alzheimer's disease [32]. People born with mutations in the telomerase gene suffer an accelerated telomeric shortening in their cells and reduced regenerative capacity of their tissues, which leads to suffering very hard diseases such as aplastic anemia, emphysema, cirrhosis and pulmonary fibrosis [33–36].

Nevertheless, in other disease types like cancer, a different phenomenon takes place as telomerase is reactivated, and therefore telomere erosion is alleviated. Consequently, cell immortality occurs and leads to an uncontrolled increase in cell division. The telomeres of some tumor cells elongate without activating telomerase, via alternative lengthening of telomeres (ALT), which implies the recombination or exchange of sister chromatids [37,38]. The pathways involved in regulating and maintaining telomeres are critical for preventing diseases, including cancer and avoiding cell deterioration [30**,39,40]. Such telomere maintenance is more effective in the cells that express telomerase [41–43]. The search for telomerase inhibitors or telomere cap inhibitors to avoid tumor development would be one of the greatest advances made to fight cancer [30**,44].

Elevated levels of psychosocial stress have been related with telomere shortening and immunological disorders, as in the study conducted by Damjanovic *et al.* [45] about relatives who have looked after Alzheimer's disease patients for long periods of time. Depression and pain can be other determining factors of telomere shortening [46–48].

It is also possible to reduce telomere erosion by practicing physical exercise [49], which offers beneficial effects by delaying certain aging symptoms and related diseases, like bone mineral density and others. Another protective factor on telomere integrity is Mediterranean diet [50].

TELOMERES AND SPERMATOZOIDS

On one hand, cells in germ line have telomerase activity and long telomeres (13–20 kb) [51,52]. On the other hand, spermatozoa do not seem to undergo the shortening that takes place in somatic cells with age [41,42]. A possibility is that telomerase was more active in the testicles of older males. This would explain why telomeres are longer than in

Table 1. Relationship between different type of cells and telomere length and telomerase activity

	Telomere length/age		Telomerase activity
	Male	Female	
Stem cells	↑↑	↑↑	+++
Mature germ cells	↑↑	↓↓	None
Healthy somatic cells	↓↓↓/↓ ^o	↓↓/↓ ^o	None/↓ ^o
Tumoral somatic cells	↓	↓	+++

^oHematopoietic, skin and intestine stem or stem-like cells

young individuals, ruling out any modification of telomere length regulation during spermatogenesis [53]. However, studies in mice models have shown that the telomere length of adult stem cell shortens with age [54], indicating that telomerase activity is not sufficient to maintain the length found at young ages and suggesting that the attrition of telomeres in cells with active telomerase may happen at a slower pace [22,19] (Table 1).

Some authors deny the theory of telomere rejuvenation in sperm by telomerase in older men's testicles and have also demonstrated that telomere lengthening in the sperm of these males is because of the ALT pathway rather than to an increase in telomerase [55]. Others defend that it is because of progressive transgenerational telomere erosion in germ series, which could even occur with the influence of the female germ series [56–58]. However, in murine models, whenever telomerase is activated at the blastocyst stage, the telomere length of the species is reset in the early embryo [59,60], acquiring the new organism a telomere length [18] that will ensure at the least, the mean life span for the species [22]. More studies are still needed to understand the reason for this telomere lengthening of spermatozooids with age and its consequences for offspring, which spells much controversy among researchers.

TELOMERE LENGTH AND INHERITANCE

If we consider that offspring receives half the chromosome load of the spermatozoid, it would seem logical to think that the length of paternal telomeres would influence the telomere length of a new individual's cells. This hypothesis has been found in many studies, which have observed that a longer telomere length of older fathers' spermatozooids influences offspring possessing cells with a long telomere length [61,62]. It has been reported that offspring of older fathers have longer leukocyte telomere length (LTL), but it is related to increased breast cancer of their daughters [63]. Paternal age of

Fertility, IVF and reproductive genetics

conception (PAC) is important for the telomere length of offspring, which is more evident in some animal species like primates, but a higher sperm production rate could also have an influence [64,65]. Whenever comparing the telomere length of oocytes and progenitor spermatozooids with the zygotes and embryos of the two generated cells, a clear dependence of spermatozooids is seen, regardless of telomerase levels [66*]. In contrast, other authors find that the zygote has shorter telomere length compared with both, oocytes and the blastocyst, which have telomerase activity and that neither oocytes nor sperm make a significant contribution to the telomere length of the offspring [67,68]. The vast majority of studies confirm that a positive relation exists between telomere length and the feminine gender, being longer telomeres found in women on average than in men. However, other factors have been considered to explain this, like exposure to estrogens or less exposure to free radicals [69].

IMPLICATIONS FOR MALE FERTILITY

Numerous studies have been conducted about the relationship between telomeres and male fertility. Indeed, the genome-stabilizing effect can be affected by several genotoxic agents, such as chemotherapy agents, as they reduce the telomere length of male germ cells, which would subsequently become testicular alterations, as would seminal parameters, including sperm DNA integrity and problems with offspring [70]. In populations of infertile patients, spermatozooids have shorter telomere length than fertile populations, but this shortening neither correlate with the sperm concentration, mobility or morphology, nor with the DNA fragmentation indices (DFI) in spermatozooids [71]. Telomere shortening in infertile patients is related to the telomeric RNA (TERRA) and also with telomerase levels, measured by the catalytic reverse transcriptase subunit [telomerase reverse transcriptase (TERT)], although the relations between TERRA and TERT do not vary [72]. These data and others seem to indicate that both telomere length and telomerase levels can be used as biomarkers of male fertility as they are related with sperm concentration and mobility, and with DFI [7*,6*,73].

Embryo quality rate and transplantable embryo rate are related with the telomere length of spermatozooids (STL), but pregnancy rates are not affected [74]. A deteriorated reproduction capacity of older men is determined by many factors, such as hormone decline, oxidative stress, inflammatory and immune diseases, sexual dysfunctions, genome instability, changes in diet, life style and telomere shortening [75].

The presence of a higher STL can have beneficial effects on fertility, thus the use of spermatozooids with a longer telomere length in an assisted reproduction technique (ART) could be one way of solving some infertility cases. Swim up and density gradient techniques obtain spermatozooids with a longer telomere length and a lower DFI. Furthermore, no significant differences between both techniques have been found [76]. However, more research is needed to further understand the implication of telomeres in male fertility in order to improve the success of ART in obtaining high-quality embryos improving human fertility.

CONCLUSION

The search for the cause of certain reproductive failures even in those men with normal spermogram is constant within the field of reproductive medicine.

The possibility that telomeres with other parameters allowed to establish new algorithms on the diagnosis of male infertility could be applied to the prognosis and treatment of this type of reproductive problems. More studies are needed to establish the influence of telomeres on sperm quality and its repercussions on fertility.

Personalized reproduction medicine would avoid treatment failures, minimizing adverse physical and psychological side effects in patients and reducing costs for patients and health service providers.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

None.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: a review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015; 8:191–196.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13:37.
3. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62:324–332.
4. Punab M, Poolamets O, Paju P, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod* 2017; 32:18–31.

De: em.rbmo.0.76abf8.5f681813@editorialmanager.com
<em.rbmo.0.76abf8.5f681813@editorialmanager.com> en nombre de Caroline Blackwell,
Managing Secretary <em@editorialmanager.com>
Enviado: viernes, 15 de octubre de 2021 12:42
Para: M^a Elisa Varela Sanz <mariaelisa.varela@ivirma.com>
Asunto: Your Submission

ADVERTENCIA: Este correo proviene de una fuente externa a la organización. No abra el contenido ni los enlaces a no ser que confíe en el remitente y sepa que el contenido es seguro.

CC: editor@rbmonline.com

Ms. Ref. No.: RBMO-D-21-00593R1
Title: Effects of age and oligosthenozoospermia on telomeres of sperm and blood cells
Reproductive BioMedicine Online

Dear Dr Varela

Thank you for addressing the reviewers' concerns in your revised manuscript.

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication in RBMO. It will proceed to production for advance online publication within 7-10 days as an unedited accepted manuscript that will be fully citable. You will be notified once it is available online. The manuscript will then undergo editing prior to typesetting, during which time you may be contacted to help resolve any queries that arise. You will be sent a proof for checking in due course.

Thank you for submitting your work to Reproductive BioMedicine Online.

Yours sincerely

Professor Bart CJM Fauser MD, PhD, FRCOG
Chief Editor
Reproductive BioMedicine Online

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/rbmo/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.



Universidad
Rey Juan Carlos