

Evaluación actual de la infertilidad masculina.

Alejandro D. Teppa-Garrán y Anselmo Palacios-Torres

Departamento de Andrología, Clínica El Ávila, Caracas, Venezuela

Palabras clave: Azoospermia, ICSI, infertilidad masculina, microdeleción cromosoma Y, biopsia testicular (TESE) y espermatograma.

Resumen. La comprensión de los eventos fisiológicos de la fertilidad masculina establece una estructura organizacional lógica y práctica para tratar con las causas de infertilidad en varones sobre la base de la fisiopatología. Los diferentes desórdenes que causan la infertilidad masculina enfatizan la naturaleza heterogénea de la infertilidad y la necesidad de una evaluación clínica integral. Usualmente, el análisis seminal provee la primera señal de un factor masculino que contribuye a la infertilidad de la pareja. La introducción de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ha transformado el manejo clínico de la infertilidad masculina. Se espera que la disponibilidad del ICSI no impida los esfuerzos de la andrología para entender, prevenir y diagnosticar la infertilidad masculina.

Current evaluation of male infertility.

Invest Clín 2004; 45(4): 355 - 370

Key words: Azoospermia, ICSI, male infertility, Y chromosome microdeletion, sperm extraction (TESE), semen analysis.

Abstract. An understanding of the physiologic events of male fertility provides a logical and practical organizational framework for dealing with the causes of infertility in men based its pathophysiology. The several disorders that cause male infertility emphasize the heterogeneous nature of infertility and the need for an integral clinical evaluation. Usually, semen analysis provides the first sign that a male factor is contributing to the couple's infertility. The introduction of the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has transformed the clinical management of the male infertility. It is to be expected that the availability of ICSI, will not impede efforts of the andrology to understand, prevent and diagnose male infertility.

Recibido: 30-09-2003. Aceptado: 15-06-2004.

INTRODUCCIÓN

Con el advenimiento de las técnicas de reproducción asistida y, más concretamente, con la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), muchas parejas afectadas por un factor masculino de infertilidad han logrado sus objetivos reproductivos. Por esta razón, muchos centros reproductivos de diferentes áreas geográficas, han puesto en duda el valor de la andrología en el diagnóstico y tratamiento tradicional de la infertilidad. Adicionalmente, ya desde hace tiempo estos estudios clínicos no son realizados por especialistas adecuadamente entrenados, limitándose en muchos lugares a la valoración del espermatograma. De esta manera, muchos especialistas en medicina reproductiva no investigan la presencia de un factor masculino y tratan directamente al paciente, sin considerar causas simples como las infecciones o la exposición a gonadotoxinas, que se pueden beneficiar de un tratamiento sencillo y de bajo costo.

Indudablemente que el ICSI es una herramienta, principalmente terapéutica, que permite alcanzar las metas reproductivas de algunos varones en ausencia de un diagnóstico etiológico y fisiopatológico; no obstante, la realización de una investigación andrológica integral permite instaurar terapias específicas, lo que facilita en muchos casos el logro de embarazos por vías naturales y, además, constituye fundamentos y objetivos de indiscutible valor íntimamente vinculados con la esencia misma del arte médico (1). La finalidad de este estudio es presentar los criterios básicos para una aproximación diagnóstica de la etiología de la infertilidad masculina.

ETIOLOGÍA DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad masculina involucra alrededor del 35% al 45% de la casuística to-

tal de la infertilidad. Las causas de la infertilidad masculina pueden ser congénitas (criptorquidea, hipospadias), infecciosas (parotiditis pospuberal, enfermedades de transmisión sexual), por patología urológica (prostatitis, litiasis), traumáticas, consecuencia de cirugía inguinoescrotal, asociadas a enfermedades pulmonares crónicas, disfunciones sexuales (eréctiles, eyaculatorias), trastornos inmunológicos, genéticas, por lesiones neurológicas, por factores ambientales, y tóxicos, tumorales o idiopáticas. Aunque, la mayoría de los casos, se deben a varicocele, infección de las glándulas sexuales accesorias, falla testicular u obstrucción, pero en muchos otros se considera de naturaleza idiopática (2-4).

Comhaire y col. (5), compararon los datos de 33 centros en 25 países diferentes observando que la incidencia del varicocele es importante, al igual que la oligospermia idiopática. En este estudio, avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de trastornos endocrinos y genéticos fue rara. A continuación se amplían las causas más interesantes.

Varicocele

La insuficiencia valvular venosa de las venas espermáticas, manifestada por una dilatación del plexo pampiniforme o varicocele, es una causa importante de infertilidad que se presenta hasta en el 40% de los varones infértiles a diferencia de una frecuencia del 15% en la población fértil. Sin embargo, para que el varicocele pueda ser considerado como una causa de infertilidad, debe estar relacionado con alteraciones en el análisis del semen. En base a ello, el varicocele es responsable de alrededor del 20% de los casos de infertilidad masculina en nuestro medio.

Aunque la relación del varicocele con la infertilidad es controversial, involucra, de acuerdo con el grado de afectación, anomalías estructurales de la cabeza del esperma-

tozoide, oligozoospermia, disminución del volumen testicular, reducción de las funciones de las células de Leydig, patología epididimaria y presencia de anticuerpos antiespermatozoides. Estas alteraciones cuantitativas y cualitativas de los parámetros seminales se relacionan con el aumento de la temperatura testicular, la hipoxia local, el reflujo de catecolaminas suprarrenales y el incremento local de productos tóxicos, como los radicales libres o especies reactivas al oxígeno (radicales libres), todo lo cual afecta la regulación endocrinológica intratesticular (6).

Infección de las glándulas accesorias masculinas

Las infecciones del tracto reproductor masculino son una causa importante de infertilidad masculina, sobre todo en nuestro medio, donde se encuentra una mayor prevalencia que en otras latitudes. En general, las infecciones de los testículos, epidídimos, próstata y vías urinarias, asociadas con pioespermia, contribuyen con alrededor del 5% de las causas de infertilidad masculina en la mayoría de los Centros de Reproducción mundiales (2). Sin embargo, en nuestra consulta de andrología hemos observado que alrededor del 15% de los pacientes presentan cultivos seminales positivos. Por su parte, Gonzáles (7), reportó que hasta el 31% de los varones que asisten a su clínica de infertilidad en Perú, tienen espermio cultivos positivos. No obstante, hay que considerar que muchos varones presentan procesos crónicos o antiguos tratados en forma incorrecta en su inicio, que provocaron obstrucción de las vías seminales y, posteriormente, fueron tratados. Por consiguiente, la verdadera incidencia de infertilidad por causa infecciosa pudiera ser mayor a lo reflejado solamente en base a espermio cultivos positivos.

En general, estas infecciones pueden producir atrofia testicular, compromiso de

las glándulas accesorias u obstrucciones de las vías seminales, además de su relación con fenómenos inmunológicos como consecuencia de la producción de anticuerpos antiespermatozoides, así como incrementos de los niveles de leucocitos seminales y radicales libres. Entre los gérmenes implicados con más frecuencia están: *Chlamydia trachomatis*, *Nisseria gonorrhoeae*, *Ureoplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus*, *Mycobacterium tuberculosis* y orquitis virales, entre otros (2). La tuberculosis, con alta prevalencia en la zona latinoamericana, se asocia con azoospermia obstructiva.

La parotiditis puede producir orquitis después de la pubertad, debido a que la inflamación testicular severa es contenida por la poco elástica túnica albugínea, conllevando a un aumento de la presión, isquemia y, potencialmente, necrosis. En la mayoría de los pacientes, la afección sólo involucra un testículo, pero puede ser bilateral en alrededor del 15% (5). Este hecho es importante, pues la producción espermática puede ser compensada por el testículo contralateral, pero cuando están involucrados los dos testículos, en la mitad de los casos puede instalarse la infertilidad (4).

Factor genético

Las causas genéticas involucran a menos del 5% de los casos, las cuales son más frecuentes cuando el número de espermatozoides es menor de 10 millones por mL, en los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico o en los hombres mayores de 40 años; no obstante, se ha observado que las causas genéticas pueden involucrar aún más casos (alrededor del 24%), cuando los hombres presentan azoospermia u oligozoospermia severa (8). La forma más común de trastorno cromosómico numérico asociado a falla testicular es el síndrome de Klinefelter, caracterizado por una fórmula

cromosómica 47 XXY, hábito eunuco, retraso mental leve, ginecomastia y azoospermia, por hipogonadismo hipergonadotrópico. En estos casos, cuando se realiza la biopsia testicular se observa hialinización de los túbulos seminíferos, ausencia de espermatozonias e hiperplasia de las células de Leydig.

Sin embargo, desde hace tiempo se conoce la existencia de varones azoospermicos con cariotipo normal, pero con deleciones en el brazo largo del cromosoma Y. Sobre este particular, Tiepolo y Zuffardi (9) describieron, en 1976, a 6 hombres con azoospermia, cariotipo normal, deleciones en el cromosoma Y, y ausencia de elementos germinales en la biopsia testicular, proponiendo con base a ello la existencia de un nuevo locus (factor de azoospermia) (10). Posteriormente, en la búsqueda de genes relacionados con este factor de azoospermia, se han realizado estudios de microdeleciones de ese locus, aislando nuevos genes (*AZFa-d*, *DAZ*, *RBM*, *CDY1*) (10-12). Estas microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y conducen a la disfunción de genes vitales para la espermatogénesis, debido a la pérdida de segmentos específicos de ácido desoxirribonucleico (ADN) (13). Se considera que estas microdeleciones del cromosoma Y son la causa genética más frecuente de infertilidad, reportadas entre el 3% al 21% de los varones infértiles, siendo la más común la confinada a la región *AZFc*, que contiene al gen *DAZ* (involucra 13% de los hombres azoospermicos y 6% con oligozoospermia severa) (8,12).

Asimismo, el 75% de los hombres con ausencia congénita de los conductos deferentes (ACCD), son portadores del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) (14). La ACCD es una causa poco frecuente de infertilidad masculina que se puede llegar a presentar en menos del 2% de los pacientes, implicando el 6% de la patología por azoos-

permia obstructiva (15). Con base a estas investigaciones, hoy en día y en la mayoría de los Centros Reproductivos del mundo se realizan estudios citogenéticos de rutina a todos los varones infértiles con un cálculo espermático menor de 5 millones (16).

Factor inmunológico

Las causas inmunológicas constituyen alrededor del 5% de la casuística. En general, los anticuerpos antiespermatozoides afectan la fertilidad de algunos individuos, debido a reacciones de citotoxicidad, aglutinación e inmovilización espermática, o alteración de las reacciones de capacitación o reacción acrosómica (2, 17).

Factor endocrino

Los trastornos endocrinos constituyen menos del 5% de las causas de infertilidad en el hombre; sin embargo, lógicamente ellos implican mayor relevancia clínica, independientemente de la infertilidad (18). Por ejemplo, los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico son muy poco frecuentes, representando alrededor del 1% de la casuística total, pero involucran otros factores que comprometen la salud del individuo. A su vez, algunos hombres obesos pueden padecer de infertilidad, al manifestar niveles séricos reducidos de las hormonas luteinizantes, testosterona (T) y globulina sexual fijadora de las hormonas sexuales, asociado a un aumento de la aromatización de la T, que modifica negativamente el radio T/estradiol (19). Por su parte, la diabetes mellitus puede provocar disfunción sexual eréctil por neuropatía autónoma simpática, que está directamente relacionada con el control y la duración de la enfermedad (20).

La hiperprolactinemia se manifiesta en el hombre como un hipogonadismo hipergonadotrópico, debido a que reduce la pulsatilidad de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH). Este hecho

refleja una reducción de los niveles de gonadotropinas y andrógenos, lo cual explica las manifestaciones clínicas que se presentan con mayor frecuencia, como son la disfunción sexual y la disminución de la libido (2). En forma crónica, puede alterarse la espermatogénesis, y presentarse ginecomastia y galactorrea.

Enfermedades sistémicas

El síndrome de Kartagener se caracteriza, estructuralmente, por la ausencia de los brazos internos y externos del axonema y, clínicamente, por infecciones respiratorias recurrentes (bronquiectasia y sinusitis), dextrocardia y esterilidad. Otras entidades nosológicas que relacionan la infertilidad con las patologías crónicas del tracto respiratorio son el síndrome de Young (similar al síndrome de Kartagener pero sin la afectación cardíaca), y la fibrosis quística, una enfermedad metabólica con patrón de herencia autosómico recesivo, común en la raza aria, caracterizada por azoospermia obstructiva debido a ACCD. Las afecciones renales y otras enfermedades sistémicas pueden comprometer de manera indirecta la fertilidad.

Displasia de la vaina fibrosa del espermatozoide

Hoy se sabe que la displasia de la vaina fibrosa del espermatozoide es una rara causa de infertilidad y de incidencia familiar, que se caracteriza por espermatozoides de baja motilidad. El diagnóstico se realiza por microscopía electrónica y el diagnóstico diferencial es con el síndrome de Kartagener, pues muchos pacientes presentan también bronquiectasia. No es susceptible de tratamiento médico, por lo que está indicado el ICSI (21). Por otra parte, cuando se afecta el centríolo del espermatozoide, el espermatozoide está desalineado, pero sin pérdida de su capacidad fecundante, aunque no ocurre la singamia y el clivaje (22).

Alteraciones nerviosas de la eyaculación

La eyaculación retrógrada ocurre cuando el esfínter urinario interno del cuello vesical presenta fallas al momento de la eyaculación, permitiendo el paso del semen a la vejiga. Usualmente, los trastornos eyaculatorios orgánicos se encuentran en pacientes que toman medicamentos antihipertensivos como los bloqueadores β -adrenérgicos o que tienen antecedentes de diabetes, esclerosis múltiple, mielitis transversa, lesiones neurológicas postraumáticas de la columna vertebral u operaciones previas como prostatectomía transuretral, simpatectomía lumbar o disección de nódulos linfáticos retroperitoneales (2).

Factor psicológico

La eyaculación precoz, que impide una inseminación vaginal adecuada, puede tener una causa sistémica por esclerosis múltiple o prostatitis, pero la más común es la psicológica. También pueden involucrar causas psicológicas la aneyaculación o ausencia de la eyaculación, además de la eyaculación retrógrada (17). Adicionalmente, muchos hombres presentan reacciones importantes de estrés, desde su inclusión en una consulta de andrología.

Cáncer testicular

Se ha observado un aumento de la prevalencia del cáncer testicular en hombres infértiles que se ha asociado a enfermedades genéticas, exposición a gonadotoxinas y otras causas (23). Por otra parte, la infertilidad masculina es también una forma de presentación del cáncer testicular, que afecta principalmente a los varones jóvenes de 30 a 40 años (24). El adenocarcinoma es el cáncer más frecuente, con predominio del seminoma de acuerdo con la variante histológica. Para tener una idea acerca de su incidencia, Schulze y col. (25), realizaron 1418 biopsias testiculares en 766 varones con compromiso severo de los paráme-

tros seminales, encontrando en cinco de ellos cáncer testicular *in situ*. En Brasil, Pasqualotto y col. (26), hallaron 7 casos de cáncer testicular en pacientes infértiles, durante un período de observación de 15 años.

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

Gonadotoxinas

Para finalizar, no se debe dejar de mencionar el daño producido por distintos agentes ambientales sobre la espermatogénesis. Sobre este particular, se tiene principalmente al alcohol y la nicotina (27, 28). El alcohol tiene un efecto inhibitorio directo sobre la biosíntesis de T por las células de Leydig y sobre el metabolismo hepático de los estrógenos; en consecuencia, se producen niveles bajos de T y altos de estradiol en la circulación, por tanto, el alcohol induce efectos directos sobre el espermatozoide generando una disminución de su motilidad. El abuso de otras drogas como la marihuana y la cocaína también comprometen la fertilidad.

Del mismo modo, los varones expuestos a ciertos solventes presentan menores concentraciones de LH, mientras los hombres expuestos a ciertos pesticidas tienen niveles séricos de estradiol elevados, disminución de la motilidad y del cálculo de los espermatozoides con incremento en las formas anormales (29). Recientemente, Mármod Maneiro y col. (30) evaluaron el perfil seminal en trabajadores del estado Zulia expuestos a organofosforados y carbamatos, que son agentes inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, y concluyeron que este tipo de plaguicidas produce oligoastenozoospermia y reducción de la vitalidad es-

permática. Otros agentes químicos que son particularmente tóxicos al testículo son el nematocida 1,2-dibromo-3-cloropropano, el funguicida dibromuro de etileno, y los metales como plomo, cadmio y mercurio, los cuales en dosis elevadas pueden destruir, inclusive, a todos los componentes del testículo. En nuestro país, existen diferentes regiones donde altos porcentajes de la población se dedican a la agricultura y la minería, en los cuales una notable exposición laboral a estos agentes debido a la poca protección de los trabajadores que los manejan. Además, cabe agregar el mayor uso de plaguicidas debido al repunte de enfermedades como el dengue y el paludismo.

Ciertas drogas de la farmacopea también tienen efectos muy negativos sobre la espermatogénesis; entre ellas destacan la sulfasalazina, la cimetidina, el ketoconazol y los agentes alquilantes como la ciclofosfamida, entre otros. Por último, como es ampliamente conocido que las radiaciones pueden provocar cambios en los cromosomas, no es extraño que se haya reportado que la radioterapia tiene mayor efecto lesivo sobre las espermatogonias (2, 31).

TERMINOLOGÍA ANDROLÓGICA

El término espermia se refiere al eyaculado total, mientras la palabra zoospermia hace mención a los espermatozoides. Entonces, cuando el volumen del semen es cero, se llama aspermia, así como cuando no hay espermatozoides en el eyaculado se hace referencia a la azoospermia. La oligozoospermia significa una concentración espermática reducida. La astenozoospermia es cuando hay baja motilidad. Cuando los espermatozoides presentan alteraciones en la forma, se utiliza el término teratozoospermia. La necrozoospermia se emplea cuando hay espermatozoides muertos. En general, la mayoría de los andrólogos utilizan combinaciones de estos términos. La

OMS (32), estableció que el semen normal tiene un volumen de 2 a 6 mL con más de 20 millones de espermatozoides por mL, la vitalidad mayor del 75%, la morfología normal superior al 30% y la motilidad progresiva lenta que supere el 50% o la progresiva rápida mayor del 25%.

INVESTIGACIÓN ANDROLÓGICA

Las piedras angulares de la investigación andrológica continúan siendo la historia clínica, el examen físico y el espermatograma de infertilidad. También, se implementan en casos seleccionados las pruebas funcionales andrológicas, las cuales evalúan algunos de los procesos celulares que los espermatozoides deben cumplir en su trayecto biológico, desde su separación del plasma seminal hasta completar la fertilización del oocito.

Historia clínica

Una vez ante el paciente, se comienza por la historia clínica, la cual permite orientar el diagnóstico; por tanto, se aconseja realizar una historia integral que comprenda básicamente el interrogatorio acerca del motivo de consulta, antecedentes patológicos personales y familiares, antecedentes de fertilidad (paciente y pareja), función sexual y hábitos psicobiológicos (para detectar la posible exposición a drogas, factores ambientales y/o laborales) (6).

Examen físico integral

A continuación, se realiza el examen físico que, aunque se evalúa todo el cuerpo, está dirigido a la zona genital y a los caracteres sexuales secundarios (fenotipo, vello axilar y púbico, barba, voz), sin olvidar descartar ginecomastia y anosmia. La exploración andrológica se enfoca sobre el pene (buscando fimosis, hipospadias, cicatrices, placas de induración), testículos y epidídimo (posición, tamaño, consistencia y sensibilidad). El volumen testicular se aprecia

mejor con el orquidómetro de Prader o el de Seager, considerándose un volumen de 20 a 24 cc como normal, mientras un volumen menor a 10 cc traduce una importante disminución del tejido espermatogénico y se correlaciona con valores elevados de FSH y bajos de inhibina, como veremos más adelante. El tacto rectal se realiza sólo en aquellos casos que se considera conveniente evaluar características de la próstata.

Para evaluar la presencia del varicocele, el paciente debe estar de pie y se le pedirá hacer maniobras de Valsalva mientras se le realizan las exploraciones semiológicas de inspección y palpación. Usualmente se emplea la clasificación de Uehling (33), que ordena el varicocele en tres grados: grado 1, cuando no es visible ni palpable pero se evidencia por las maniobras de Valsalva; grado 2, no es visible pero sí palpable; grado 3, es claramente visible.

Espermatograma de infertilidad

Es fundamental dar al paciente las instrucciones usuales acerca del método para colectar el espécimen de semen, su envío al laboratorio y hacer énfasis en la importancia del tiempo de abstinencia para aumentar el volumen espermático y el número de espermatozoides.

La valoración del espermatograma se inicia con sus características macroscópicas, que comprenden fundamentalmente al volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad y olor. Posteriormente, se inicia el estudio microscópico, mediante el cual se estudian en forma cuantitativa y cualitativa a los espermatozoides, la aglutinación (cuando están vivos, unidos entre sí) o la agregación (cuando están probablemente muertos, unidos a otras células y *debris*), entre ellos y la existencia de otras células, como leucocitos (por medio de coloraciones de peroxidasa, tipo benzidina-cianosina o azul de Toluidina) (34). Para evaluar todo ello se emplea un microscopio con aumento de 400X. Clá-

sicamente, la valoración cuantitativa del semen se reporta de acuerdo con los valores preestablecidos por la OMS (32). La concentración espermática se calcula rápidamente mediante el empleo de cámaras especializadas, como: Makler, Horwell, Petroff-Hausser, Microcell, el hemocitómetro de Neubauer o el portaobjetos de Chartpak (34). Desde hace poco tiempo, se utilizan sistemas tecnológicos comerciales para análisis de imágenes digitales de cantidad, motilidad y características del movimiento de los gametos masculinos, conocidos como análisis espermático asistido por computadora (CASA), los cuales han venido superando las limitaciones originales y aunque permiten un examen más objetivo, no reemplazan al espermatograma tradicional.

La morfología espermática evaluada por los criterios estrictos de Krüger, provee el mejor valor pronóstico dentro de los programas de fertilización *in vitro* (FIV), debido a que representa una prueba global de la función espermática. Para ello, se evalúan extendidos de una muestra de semen fresco teñidos con la coloración de Papanicolau modificada para espermatozoides. El espermatozoide debe observar una configuración ovalada donde la incorporación acrosómica debe ser de forma adecuada y ocupar de 40% a 70% de la cabeza, sin defectos en la pieza media, o cola. Un estudio realizado por Krüger y col. (35) reveló que en aquellas parejas sometidas a procedimientos de FIV, la tasa de fertilización fue de 7,6% en el grupo que tenía menos de 4% de formas normales, a diferencia del 63% cuando la morfología es mayor del 14% (35).

Las pruebas de vitalidad espermática, evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide por exclusión de colorantes o por el hinchamiento de la membrana plasmática. Esta última, es una prueba sencilla que valora la capacidad de la membrana plasmática para regular el flujo de agua e iones y tiene una relación significativa con

los resultados de la inseminación intrauterina (IIU), la FIV y el ICSI (36). Los resultados considerados normales de la viabilidad espermática deben ser mayores del 75%, en el caso de las tinciones, o superior al 60%, con las pruebas hipoosmóticas. Las pruebas de vitalidad espermática son usadas para distinguir entre casos de necrozoospermia o de espermatozoides inmóviles, como en el síndrome de Kartagener (34). En cambio, la prueba de supervivencia espermática consiste en la evaluación del porcentaje de espermatozoides móviles luego de 24 horas de preparada la muestra de semen. El valor normal es cuando supera el 20% y también tiene muy buena correlación con las tasas de gestación por IIU (37).

Básicamente, la valoración bioquímica del semen refleja los productos de la secreción de las glándulas accesorias. Estas sustancias son muy útiles para diagnosticar la presencia o ausencia de infección o disfunción de una glándula en particular. Entre todos los parámetros cuantificables destaca la medición de la fructosa, un marcador de la función de las vesículas seminales que es muy útil para distinguir entre los casos de azoospermia obstructiva o secretora, porque los niveles bajos de fructosa se observan cuando la azoospermia es obstructiva. Por otra parte, se han cuantificado menores niveles de L-carnitina (total y libre) y zinc, estadísticamente significativos, en plasma seminal de varones infértiles respecto a varones fértiles (34, 38, 39).

Por contraste, la valoración bioquímica del espermatozoide permite el estudio íntimo de los procesos moleculares implicados en la funcionalidad del mismo. De esta manera, existen ensayos para determinaciones de la acrosina, contenido de ATP, medición de la condensación de la cromatina, producción de radicales libres y cantidad de enzimas como la hialuronidasa o la creatinquinasa (34). Asimismo, es posible detectar cambios apoptóticos en las membranas

plasmáticas y mitocondriales de fracciones seminales con baja motilidad de pacientes infértiles (40). Recientemente, la determinación de radicales libres ha tomado particular interés porque pueden estar involucrados en el mecanismo del daño al espermatozoide en situaciones de infección, traumatismo o autoinmunidad (41).

Existen otras pruebas funcionales espermáticas que permiten obtener una idea acerca de la capacidad fecundante del espermatozoide. Entre las que evalúan la capacidad de transporte están: la prueba de interacción moco-semen in vivo (prueba poscoital) o la de interacción moco-semen in vitro (la prueba de Kremer, la de Miller-Kurzrok o la que emplea moco-semen cruzados). Por otra parte, existen otras pruebas que miden la habilidad fertilizante, tales como la monitorización con lectinas de las modificaciones de las glicoproteínas espermáticas durante la capacitación, la prueba de hinchazón hipoosmótica para valorar la funcionalidad de la membrana plasmática, la evaluación acrosomal (por medio de tinciones diferenciales, anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia o microscopía electrónica), el ensayo de unión a la zona pelúcida en hemizona (para comparar los espermatozoides del paciente con controles), y la penetración de oocitos de hámster a los que se ha removido la zona pelúcida (34). Las pruebas de unión a zona pelúcida y de penetración del espermatozoide al oocito desnudado de hámster, son simplemente modelos experimentales que intentan predecir el comportamiento del espermatozoide en el momento de la fertilización; sin embargo, el alto porcentaje de falsos positivos así como la baja reproducibilidad entre diversos laboratorios han influido para desaconsejar su uso rutinario.

A manera de resumen, muchos Centros Reproductivos prefieren en la actualidad, basarse en la morfología espermática según criterio de Krüger y realizar pruebas

de reacción acrosómica inducida y ensayos de estrés oxidativo, debido a que ofrecen más simplicidad y mayor valor predictivo en los resultados de la fecundación (37).

Cultivos seminales y anticuerpos contra bacterias

La infección de las glándulas sexuales se sospecha cuando el paciente tiene oligo, asteno o teratozoospermia, y posiblemente con antecedentes de infecciones urinarias, enfermedades de transmisión sexual, historia previa de epidídimo y conductos deferentes engrosados o dolorosos, o evidencia clínica actual de infección o inflamación genitourinaria. Asimismo, la presencia de espermaglutinación mayor del 10% o cuando el número de leucocitos en el semen es alto (mayor de 1 millón por mL), se debe sospechar que esté involucrado un factor infeccioso de infertilidad. En todos estos casos se aconseja realizar un cultivo seminal más antibiograma, para tener una base etiológica más precisa, así como terapéutica (1).

Por otra parte, se utilizan como marcadores de la respuesta inflamatoria en el semen a la concentración de leucocitos, a la elastasa de granulocitos y a la determinación de la albúmina seminal (42). Además, se puede detectar la presencia de anticuerpos séricos y en el plasma seminal contra distintos gérmenes como la *Chlamydia trachomatis*, lo cual sirve como método de pesquisa en el varón y para relacionarlo a un probable compromiso de las trompas de Falopio de la pareja (2). Desde hace muy poco tiempo, algunos Centros de Reproducción utilizan técnicas de biología molecular para identificar la presencia de patógenos. En tal sentido Van den Brule y col. (43), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, detectaron la presencia de *Chlamydia trachomatis* en el 16% de los hombres que asistieron a una clínica de infertilidad, todos ellos asintomáticos y sin evidencia clínica de infección mediante estudios convencionales.

Detección anticuerpos antiespermatozoides

Los estudios para valorar la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en líquidos biológicos (plasma seminal, moco cervical, secreciones vaginales y oviductales) son la reacción cruzada de antiglobulinas (*MAR-test*), que detecta inmunoglobulina A (IgA) y es significativa cuando es mayor del 10%, y el Immunobeads, específico para IgG, IgM, IgA (significativo cuando es superior al 20%). Para detectar anticuerpos circulantes, se emplean el ensayo cruzado de anticuerpos asociados a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (34).

Perfil hormonal

La evaluación endocrinológica se realiza en todos los hombres con parámetros seminales anormales o con alteraciones clínicas de baja androgenización, aunque se recomienda realizarla en todos los varones infértiles. Básicamente se miden FSH, LH y T. Cuando ocurre un hipogonadismo hipogonadotrópico, además hay que valorar la prolactina y la tirotropina (TSH) y realizar resonancia magnética nuclear de la silla turca, para investigar si existe la presencia de patología hipotalámico-hipofisiaria. Este último examen está indicado sobre todo en los casos cuando los testículos estén muy disminuidos de tamaño, la prolactina sea superior a 100 ng/mL o existan manifestaciones neurológicas por lesión de ocupación de espacio. Contrariamente, si se presenta un hipogonadismo hipergonadotrópico es conveniente realizar un cariotipo. Si este último resulta alterado, es posible considerar realizar una biopsia testicular, sólo si el testículo es de buen tamaño (mayor de 5 ó 10 cc), pues de lo contrario la posibilidad de encontrar espermatozoides es prácticamente nula.

La prueba de estimulación con la hormona gonadotropina coriónica (hCG) evalúa en forma dinámica la reserva funcional

de las células de Leydig, y consiste en la administración de 5000 UI intramusculares de hCG y la cuantificación de la T a las 72 horas. Cuando la espermatogénesis es manifiesta, los valores de T pos-hCG alcanzan los 16 ng/mL, mientras cuando hay falla de la misma los valores séricos no superan los 5 ng/mL (44,45). Esta prueba es fundamental en el estudio de pacientes con falla testicular, característica del síndrome de Klinefelter. Igualmente, se puede medir en casos seleccionados, la reserva funcional de las células de Sertoli a través de la administración de 150 UI de FSH y midiendo los niveles de inhibina a las 0 h, 24 h y 48 h.

Ultrasonido-Doppler testicular

El eco-doppler testicular ha incorporado el concepto del varicocele subclínico, es decir, aquel varicocele no evidente por examen físico sino por esta nueva tecnología. Aunque para algunos andrólogos la relevancia del varicocele subclínico en infertilidad masculina sea discutible, para otros puede influir negativamente en la calidad y la cantidad espermática (6). La ultrasonografía transrectal es determinante cuando se desea evaluar a la próstata, las vesículas seminales y los conductos eyaculadores en pacientes con hipo o aspermia.

Biopsia testicular

La biopsia testicular se emplea como diagnóstico, así como para obtener espermatozoides para ser usados en ICSI. Se aconseja realizar la biopsia testicular por la técnica abierta (TESE), tanto con fines diagnósticos como para la recuperación de los espermatozoides para ICSI, en contraposición a la obtención de los espermatozoides testiculares por aspiración con aguja fina (TESA). No obstante, en casos de azoospermia secretora es preferible realizar TESA, porque esta técnica facilita el acceso a un mayor número de áreas del testículo y

reduce la posibilidad de provocar complicaciones. En los casos de azoospermia secretora, las probabilidades de hallar espermatozoides en la punción testicular serán mayores en los casos de hipoespermatogénesis, en contraste con los casos de detención de la maduración, síndrome de sólo células de Sertoli o hialinización tubular. Sin embargo, ambas técnicas no están exentas de complicaciones, a lo que se agrega el hecho de que al repetirlas son más difíciles y con menos posibilidad de hallar espermatozoides (TESE/TESA exitoso), que en el primer intento. A más de esto, sólo un 50% de los varones con azoospermia secretora presentan espermatogénesis progresiva en el parénquima testicular (12). Gottschalk-Sabag y col. (46), recomiendan estudiar más de un espécimen testicular para evaluar el proceso espermatogénico satisfactoriamente, en forma similar al estudio de los espermatoigramas seriados. Llama la atención el trabajo de Schulze y col. (25), quienes con base a hallazgos histológicos y resultados de TESE, observaron que usualmente la calidad de la espermatogénesis del testículo derecho es superior. En general, las indicaciones más frecuentes de biopsia testicular por infertilidad son la azoospermia, la oligozoospermia grave, la criptorquidea y la disfunción eyaculatoria (6).

Con el objetivo de predecir el éxito en la extracción testicular de los espermatozoides se han desarrollado varios parámetros, tales como el volumen testicular, la FSH, la inhibina y la histopatología testicular previa. El volumen testicular es importante, porque los túbulos seminíferos constituyen aproximadamente el 85% de la gónada, pero tiene un bajo poder predictivo debido a que pueden existir variaciones topográficas de diferentes alteraciones testiculares independientes del volumen; sin embargo, un volumen testicular muy bajo (< 5 mL), indica con seguridad que no ocurre espermatogénesis. La FSH se relaciona

inversamente con el número de células germinales testiculares y no guarda relación con la cantidad de espermatozoides en el eyaculado; por esta razón, los niveles de FSH tienen alta sensibilidad pero baja especificidad para predecir la práctica de una TESE exitosa. Por ejemplo, en pacientes con arresto de la espermatogénesis a nivel de espermatocito o de espermátide, la población de espermatogonias serán normales y la FSH también, aunque en el eyaculado no se hallarán espermatozoides. Por su parte, la inhibina B es un excelente marcador de la espermatogénesis, cuyos niveles séricos se cuantifican disminuidos cuando existe daño testicular irreversible, por tanto, tiene correlación negativa con las cifras de FSH. Un valor de inhibina B menor a 40 pg/mL, tiene una sensibilidad de 90% y una especificidad de 100% para prácticamente descartar la posibilidad de un TESE exitoso; por consiguiente, es un excelente predictor de la existencia de espermatozoides en el testículo (47).

En la práctica, en los casos cuando la inhibina es normal y la TESE es negativa, se recomienda repetir el TESE para buscar nuevamente y mejor a los espermatozoides. No obstante, no hay que extralimitarse en esta conducta, pues podría causar complicaciones por iatrogenia en el paciente, tales como infecciones, hemorragia, fibrosis e, inclusive, andropausia precoz. Por otra parte, el uso de una tinción especial para el fluido seminal denominada May-Grünwald-Giemsa, especial para detectar a las espermátides redondas o los espermatocitos primarios en el eyaculado, tiene una sensibilidad alta y una especificidad baja, pero posee las ventajas de su sencillez y bajo costo (48). Por su parte, la detección de espermátides en el semen mediante inmunofluorescencia tiene muy buena correlación con el TESE, aunque es una técnica más compleja que las anteriores. Finalmente, es obligatorio recordar que al revisar la

biopsia testicular por infertilidad, se debe realizar siempre el estudio histopatológico rutinario para no pasar por alto ningún caso de cáncer testicular y, especialmente, cuando hay pacientes con criptorquidea, para descartar una degeneración maligna (35).

Evaluación de la oligo-asteno-teratozoospermia

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

La astenozoospermia pura se asocia a defectos genéticos de la estructura del flagelo, como el síndrome de Kartagener, que se identifica mediante microscopía electrónica. No obstante, la deficiencia motriz del espermatozoide puede proceder desde su origen testicular, en su paso por el epidídimo, o al confluir con otros elementos del plasma seminal. En general, la oligoastenozoospermia es la entidad observada con más frecuencia.

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

Evaluación de la azoospermia

Es importante destacar que el diagnóstico de azoospermia se basará en por lo menos dos espermatogramas de calidad y, además, debe ser realizado posterior a la centrifugación del semen. A continuación, es

importante investigar la posible causa de la azoospermia, básicamente, diferenciar entre si es obstructiva o secretora. En general, la orientación hacia la azoospermia de causa obstructiva vendrá dada por los antecedentes personales a episodios de epididimitis, prostatitis o cirugía inguinoescrotal. En caso de asociarse con ausencia congénita de los conductos deferentes, posiblemente involucra a una causa genética adicional. Por contraste, la azoospermia secretora o no obstructiva es consecuencia de una estimulación hormonal inadecuada y se sospecha por los antecedentes de criptorquidea, orquitis, traumatismos, radio o quimioterapia. Las situaciones de azoospermia secretora son por causas pretesticulares o consecuencia de arrestos de la espermatogénesis, síndrome de sólo células Sertoli, hialinización testicular o hipoespermatogénesis severa (6).

Clínicamente, la azoospermia de causa obstructiva se caracteriza por testículos de buen tamaño pero aumentados de consistencia. Cuando hay ACCD, obviamente éstos no serán palpables. Hormonalmente, las gonadotropinas y el tenor androgénico son normales. En el semen se detectan valores de ácido cítrico aumentado y fructosa bajos, con reacción de pH ácida. En cambio, la azoospermia secretora cursa con testículos de tamaño y consistencia reducidos, o en ciertos casos, ausencia de los mismos. Los valores de ácido cítrico, fructosa y pH son normales, mientras la FSH está elevada (2, 6). Básicamente, las alteraciones de las células germinales se descartan con una biopsia testicular normal, preferiblemente mediante varias punciones simultáneas, aunque se pueden realizar otras exploraciones para investigar la obstrucción de las vías seminales. En este sentido, la obstrucción se puede hacer evidente con una deferentovesiculografía, la cual se realiza pasando a través de los conductos deferentes 3 a 5 mL de Hypaque al 25% o 45% (2, 49).

Como parte del diagnóstico diferencial hay que chequear la orina poseyaculación para descartar una eyaculación retrógrada. Curiosamente, esta última se sospecha cuando ocurre el orgasmo sin la eyaculación. En algunos casos de pacientes afectados por el síndrome de del Castillo, un tipo de azoospermia secretora caracterizada por aplasia de las células germinales y donde las únicas células existentes dentro de los túbulos seminíferos son las de Sertoli, no hay que perder las esperanzas porque, probablemente, no todos estos casos son puros y, en consecuencia, se han descrito casos de hallazgos de espermatozoides mediante TESE, seguido por embarazos exitosos.

CONCLUSIONES

Aunque actualmente se reconoce el gran potencial de ICSI y reconociendo el gran potencial de esta técnica, creemos que la andrología mantiene su alto valor en la actualidad, la cual se continúa enriqueciendo todos los días con múltiples investigaciones provenientes de todo el orbe, buscando comprender mejor a la infertilidad masculina como enfermedad y tratando de introducir mejores formas de diagnóstico.

Siempre es conveniente realizar un abordaje diagnóstico sin fisuras antes de instaurar el tratamiento. Como se ve, la infertilidad masculina se puede vestir con numerosos trajes y solamente la pupila de un andrólogo experimentado puede hacer una clara distinción. Si bien es cierto que el diagnóstico médico se realiza a través de los datos obtenidos de la historia clínica conyugal, el examen físico y el análisis seminal, se puede refinar el diagnóstico por medio de las pruebas de función espermática y otras evaluaciones clínicas. La evaluación del espermatograma de infertilidad incluye un análisis seminal primario sencillo. Realizar un sólo análisis seminal no es suficiente para lograr un diagnóstico certero debido a que existe mucha variabilidad en la concentración espermática entre las muestras de un mismo individuo; por tanto, es necesario comparar entre dos a tres espermatogramas, particularmente en los casos cuando se observa una concentración espermática baja. Si éste incluye algunas alteraciones, se hace imperativo realizar pruebas seminales funcionales complementarias y evaluaciones clínicas adicionales (Tablas I y II).

TABLA I
EVALUACIÓN SEMINAL EN LA INFERTILIDAD MASCULINA

Factor a evaluar	Prueba seminal
Características del plasma seminal	Biofísicas (volumen, viscosidad, olor, lieuefacción, color). Bioquímicas (pH, fructosa)
Características de los espermatozoides	Concentración, movilidad, morfología, vitalidad
Estudio de células seminales	Leucocitos, células germinales inmaduras
Pruebas de vitalidad espermática	Pruebas hipoosmóticas, colorantes
Bioquímica de los espermatozoides	Acrosina, ATP, hialuronidasa, radicales libres
Función de los espermatozoides	Krüger, reacción acrosómica, penetración espermática, unión a zona pelúcida
Microbiológicos	Cultivos seminales, detección de anticuerpos contra <i>Chlamydia trachomatis</i>
Perfil inmunológico	Detección de anticuerpos antiespermáticos

TABLA II
ESTUDIO DEL HOMBRE INFÉRIL

Evaluación	Importancia
Historia clínica integral	Para orientar la evaluación
Examen físico completo	Posibles causas asociadas
Orquidómetro	Volumen testicular
Espermatograma de infertilidad	Piedra angular
FSH, LH, T, PRL, TSH, inhibina	Factor endocrino
Eco-Doppler	Detección varicocele
Biopsia testicular	Diagnóstico tipo infertilidad y obtención de espermatozoides
Cariotipo, gen azoospermia, fibrosis quística	Estudio genético

Es conveniente separar las herramientas diagnósticas de las terapéuticas; por tanto, éstas deben aplicarse de manera secuencial y no en forma simultánea. Luego, en los casos en que se considere que la pareja deba acudir a un programa de técnicas de reproducción asistida, es recomendable realizar estudios clínicos más complejos. Es obligatorio realizar una pesquisa metódica de posibles alteraciones genéticas en parejas seleccionadas para ICSI. El soporte psicológico por parte de un especialista es esencial. Por último, creemos que una investigación andrológica integral permitirá desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas, que potencialmente superarán los resultados actuales del ICSI.

REFERENCIAS

1. **Teppa Garrán AD, Palacios Torres A.** Tratamiento convencional y avanzado de la infertilidad masculina. *Reprod Hum* 2003; 3:32-40.
2. **Edwards RG, Brody SA.** Principles and practice of assisted human reproduction. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1995. p.109-149.
3. **González GF.** Tratamiento de la infertilidad masculina. En: González GF, ed. *Andrología, fertilidad e infertilidad*. Lima: Ediciones Instituto de Investigaciones de la Altura; 1992. p.173-208.
4. **Perez Peña E.** Atención integral de la infertilidad. *Endocrinología, cirugía y reproducción asistida*. México: MC Graw Hill; 2003.
5. **Comhaire FH, De Kretser D, Farley TNM.** Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility: results of World Health Organization multicentre study. *Int J Androl* 1987; 10:1-53.
6. **Rodríguez M, Navarro J, Grimalt L, Remohi J, Gil Salom M.** Diagnóstico y conducta a seguir en el varón. En: Remohi J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J, editores. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana* 2000. p.51-64.
7. **González GF.** Infecciones en el tracto reproductor masculino. En: González GF, ed. *Andrología, fertilidad e infertilidad*. Lima: Ediciones Instituto de Investigaciones de la Altura; 1992. p.149-163.
8. **Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, Van den Ouweland AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC.** Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 13-16.
9. **Tiepolo L, Zuffardi O.** Localization of factors controlling spermatogenesis in non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-124.
10. **Cooke HJ, Hargreave T, Elliot DJ.** Understanding the genes involved in spermatogenesis: a progress report. *Fertil Steril* 1998; 69:989-995.

11. **Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meisner L, Chandely A, Gouchy G, Jorgenseu L, Hanghurst T, Grosch J.** Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:27-41.
12. **Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC.** Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17:2813-2824.
13. **Vogt PH.** Molecular genetic of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2004; 10:471-500.
14. **Pradal U, Piacentini GL.** Cystic fibrosis patients, infertile men, and their noses. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 141-142.
15. **Quinzii C, Castellani C.** The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 684-689.
16. **Quilter CR, Svennevik EC, Serhal P, Ralph D, Bahadur G, Stanhope R, Sutterlin M, Delhanty JD, Taylor KE.** Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening of a random group of infertile males. *Fertil Steril* 2003; 79: 301-307.
17. **Brugo Olmedo S, Chillik CF, Kopelman S.** Definición y causas de infertilidad. *Rev Med Reprod CEGYR* 2002; 5:29-45.
18. **Jarow JP.** Endocrine causes of male infertility. *Urol Clin North Am* 2003; 30:83-90.
19. **Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT.** Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology* 1993; 42:171-179.
20. **Dinulovic D, Radonjic G.** Diabetes mellitus and male infertility. *Arch Androl* 1990; 25:277-284.
21. **Olmedo SB, Rawe VY, Nodar FN, Galaverna GD, Acosta AA, Chemes HE.** Pregnancies established through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using spermatozoa with dysplasia of fibrous sheath. *Asian J Androl* 2000; 2:125-130.
22. **Rawe VY, Terada Y, Nakamura S, Chillik CF, Olmedo SB, Chemes HE.** A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum Reprod* 2002; 17: 2344-2349.
23. **Presti JC, Herr HW, Carroll PR.** Fertility and testis cancer. *Urol Clin North Am* 1993; 20:173-198.
24. **Palacios A.** Azoospermia en cáncer de testículo: obtención de embarazo por ICSI. XV reunión de ALIHR, 1997 Abr 27-30. Cusco, Perú.
25. **Schulze W, Thoms F, Knuth UA.** Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* 1999; Sep 14 Suppl 1:82-96.
26. **Pasqualotto FF, Pasqualotto EB, Agarwal A, Thomas AJ.** Detection of testicular cancer in men presenting with infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003; 58: 75-80.
27. **Klonoff-Cohen H, Lam-Kruglick P, González C.** Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 2003; 79:330-339.
28. **Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA.** Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003; 79:287-291.
29. **Oliva A, Spira A, Multigner L.** Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1768-1776.
30. **Mármol-Mancero L, Fernández D'Pool J, Sánchez BJ, Sirit Y.** Perfil seminal en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. *Invest Clin* 2003; 44:105-117.
31. **Bellorín-Fernández M, Fernández-D'Pool J.** Human lymphocyte chromosome changes induced by x-rays. *Invest Clin* 2002; 43:157-171.

32. **World Health Organization, WHO.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
33. **Uehling DT.** Fertility in men with varicocele. *Int J Fertil* 1968; 13:58.
34. **Mortimer D.** Practical laboratory andrology. Oxford University Press, 1994.
35. **Kruger TF, Acosta AA, Simmonds KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LI, Morshedi M, Bruño S.** New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology* 1987; 30:248-251.
36. **Kiefer D, Check JH, Katsoff D.** The value of motile density, strict morphology and the hypoosmotic swelling test in in vitro fertilization-embryo transfer. *Arch Androl* 1996; 77:57-60.
37. **Montes JM, Cantú L, Cánepa ME, Alcaturi J, Machado MJ, Brúné MN.** ¿Es posible obtener del estudio de semen mejores predictores de fertilidad? *Reprod Hum* 2004; 4:15-24.
38. **Matalliotakis I, Koumantaki Y, Evageliou A, Matalliotakis G, Goumenou A, Koumantakis E.** L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45:236-240.
39. **Zöpfigen A, Priem F, Sudhoff F, Jung K, Lenk S, Loening SA, et al.** Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod* 2000; 15:840-845.
40. **Barroso G.** Marcadores selectivos en la disfunción de los potenciales de membrana mitocondrial y de disrupción fosfoproteica en la membrana plasmática en la fase inicial de los procesos apoptóticos en la fracción espermática. *Reprod Hum* 2002; 2:22-27.
41. **Pasqualotto F, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A.** Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000; 73:459-464.
42. **Eggert-Kruse W, Probst S, Rohr G, Aufenanger J, Runnebaum B.** Screening for subclinical inflammation in ejaculates. *Fertil Steril* 1995; 64:1012-1022.
43. **Van den Brule AJ, Hemrika DJ, Walboomers JM, Raaphorst P, Van Amstel N, Bleker OP, Meijer CJ.** Detection of Chlamydia trachomatis in semen of artificial insemination donors by the polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1993; 59:1098-1104.
44. **Madgar I, Dor J, Weissenberg R, Raviv G, Menashe Y, Levron J.** Prognostic value of the clinical and laboratory evaluation in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome who are receiving assisted reproductive therapy. *Fertil Steril* 2002; 77:1167-1169.
45. **Hernández-Yáñez L, Marín-López G, Vílchez-Martínez J, Bishop W.** Leydig cell function in experimental cryptorchism and varicocele in rats. *Invest Clin* 1999; 40:95-108.
46. **Gottschalk-Sabag S, Weiss DB, Folb-Zacharow N, Zukerman Z.** Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis? *Fertil Steril* 1995; 64:399-402.
47. **Ballesecá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, De Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell VA.** Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15:1734-1738.
48. **Amer M, Abd Elnasser T, El Haggar S, Mostafa T, Abdel-Malk G, Zohdy W.** May-Grünigald-Giemsa stain for detection of spermatogenic cells in the ejaculate: a simple predictive parameter for successful testicular sperm retrieval. *Hum Reprod* 2001; 16:1427-1432.
49. **Purohit RS, Wu DS, Shinohara K, Turek PJ.** A prospective comparison of 3 diagnostic methods to evaluate ejaculatory duct obstruction. *J Urol* 2004; 171:232-235.