



Universitat de Girona

# UTILIDAD DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA TESTICULAR CON ESPECTROSCOPIA EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INFERTILIDAD

**Sandra BALEATO GONZÁLEZ**

**Dipòsit legal: GI. 280-2013**

<http://hdl.handle.net/10803/104486>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Girona**

**UTILIDAD DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA  
TESTICULAR CON ESPECTROSCOPIA EN EL  
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INFERTILIDAD**

Tesis presentada por

**Sandra Baleato González**

Directores de la tesis:

**Joan Carles Vilanova Busquets**

**Josep Comet Balle**

Girona, Julio 2012

**DOCTORAT EN CIÈNCIES EXPERIMENTALS I SOSTENIBILITAT**

Memòria presentada per optar al títol de doctora Europea per la  
Universitat de Girona





Universitat de Girona

El Dr. Joan Carles Vilanova Busquets, professor associat del Departament de Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona,

CERTIFICO:

Que aquest treball, titulat "**Utilidad de la resonancia magnética testicular con espectroscopía en el análisis cuantitativo de la infertilidad**", que presenta Sandra Baleato González per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requeriments per poder optar a Menció Europea.

Signatura

Girona, 11 de juliol de 2012





Universitat de Girona

El Dr. Josep Comet i Batlle, professor associat del Departament de Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona,

CERTIFICO:

Que aquest treball, titulat "**Utilidad de la resonancia magnética testicular con espectroscopía en el análisis cuantitativo de la infertilidad**", que presenta Sandra Baleato González per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció i que compleix els requeriments per poder optar a Menció Europea.

Signatura

Girona, 11 de juliol de 2012



*A mis padres, a mi hermana y a Roberto*





## **Agradecimientos**

Para todos aquellos que me han apoyado en estos años de carrera profesional y que han confiado siempre en mí, permitiendo así que haya nacido este trabajo.

Al profesor Vilanova, mi más sincero agradecimiento por ser para mí mucho más que un director de Tesis y deberle en gran medida lo que hoy soy como radióloga. Muchísimas gracias.

Al profesor Comet, por su dedicación y consejos que han permitido la elaboración de esta tesis.

A Soledad, por esas tardes que pasamos juntas y por todos esos e-mails que nos cruzamos, ya que sin su desinteresada ayuda para el soporte estadístico, este trabajo no hubiera sido posible.

A Coté, por haberme ayudado también en la complicada parte estadística y aportar siempre nuevas ideas.

A Michel Herranz. Las razones del destino y de la propia vida posibilitaron que naciese esta Tesis Doctoral y con ello una amistad.

Al Doctor Meijide, urólogo del Hospital POVISA, que creyó en este trabajo y facilitó que los pacientes participasen en el estudio.

Al Doctor Barceló, al Dr. Villalón, al Dr. Fernández y al Dr. Tomás, por no ser sólo mentores radiológicos sino amigos y contribuir con su alegría y confianza.

A Roberto, por apoyarme cada día en mi vida laboral y animarme a superarme siempre como profesional.

En especial, a mi hermana, por compartir conmigo su vida y por entender como soy.

*Gracias a todos ellos.*

*Con su energía, tiempo y dedicación han apoyado esta tesis.*



# **ÍNDICE**

<b><u>ÍNDICE GENERAL</u></b> .....	III
<b><u>ÍNDICE DE TABLAS</u></b> .....	IX
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b> .....	XIII
<b><u>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</u></b> .....	XIX
<b><u>ÍNDICE DE TERMINOLOGÍA</u></b> .....	XXI
<b><u>RESUMEN</u></b> .....	XXIII



# ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. DEFINICIÓN</b>	1
<b>1.2. HISTORIA DE LA INFERTILIDAD</b>	2
<b>1.3. EPIDEMIOLOGÍA, IMPACTO Y FACTORES PRONÓSTICOS</b>	6
<b>1.4. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR</b>	10
1.4.1. Testículos	11
1.4.2. Vías espermáticas: Epidídimo	13
1.4.3. Vías espermáticas: Conducto deferente	13
1.4.4. Vías espermáticas: Conducto eyaculador	14
1.4.5. Uretra	14
1.4.6. Vesículas seminales	14
1.4.7. Próstata	15
1.4.8. Glándula bulbouretral	15
1.4.9. Pene	16
1.4.10. Escroto	16
<b>1.5. FISIOPATOLOGÍA</b>	17
1.5.1. Testículos	17
1.5.2. Regulación hipotálamo-hipofisaria	21
1.5.3. Papel del cromosoma Y	21
1.5.4. Papel del epidídimo, próstata y vesículas seminales	22
<b>1.6. CAUSAS DE INFERTILIDAD</b>	22
1.6.1. Pretesticulares	22
1.6.1.1. Endocrinopatías	22
1.6.1.1.1. Insuficiencia del eje hipotálamo-hipofisario	23
1.6.1.1.2. Bloqueo del eje hipotálamo-hipofisario	23
1.6.1.2. Endocrinopatías genéticas	23
1.6.2. Testiculares	24
1.6.2.1. Causas Genéticas	24

1.6.2.2. Causas no genéticas .....	26
1.6.2.2.1. Varicocele .....	26
1.6.2.2.2. Criptorquidia .....	27
1.6.2.2.3. Exposición a gonadotóxicos .....	27
1.6.3. Post-testiculares .....	28
1.6.3.1. Obstrucción de la vías seminales .....	28
1.6.3.2. Disfunción eréctil y/o eyaculatoria .....	29
1.6.3.3. Infertilidad inmunológica .....	29
<b>1.7. ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA .....</b>	<b>30</b>
1.7.1. Historia clínica .....	30
1.7.2. Examen físico .....	30
1.7.3. Estudios complementarios básicos .....	31
1.7.3.1. Espermograma .....	31
1.7.3.1.1. Características del plasma seminal .....	32
1.7.3.1.2. Características de los espermatozoides .....	33
1.7.3.2. Espermocultivo .....	35
1.7.3.3. Búsqueda de eyaculación retrógrada .....	36
1.7.3.4. Estudio hormonal .....	36
1.7.3.5. Bioquímica seminal .....	36
1.7.3.5.1. Marcadores del epidídimo .....	37
1.7.3.5.2. Marcador de las vesículas seminales .....	37
1.7.3.5.3. Marcador de la próstata .....	37
1.7.4. Estudios complementarios avanzados .....	38
1.7.4.1. Estudio de inmunidad .....	38
1.7.4.2. Pruebas de fertilidad del esperma .....	39
1.7.4.2.1. Prueba de interacción moco cervical-esperma .....	39
1.7.4.2.2. Análisis del movimiento de los espermatozoides asistido por ordenador (CASA). .....	39
1.7.4.2.3. Estudio de la reacción acrosómica .....	40
1.7.4.2.4. Prueba de fijación a la zona pelúcida .....	40
1.7.4.2.5. Prueba de fecundación heteroespecífica .....	40

1.7.4.2.6. Pruebas para explorar la calidad del núcleo espermático .....	41
1.7.5. Estudio genético .....	41
1.7.5.1. Anormalidad en el cariotipo .....	41
1.7.5.2. Mutación del gen de la fibrosis quística .....	41
1.7.5.3. Microdeleciones del cromosoma Y .....	41
1.7.6. Pruebas invasivas .....	42
1.7.7. Técnicas de imagen .....	42
1.7.7.1. Ecografía .....	42
1.7.7.2. Resonancia magnética .....	44
1.7.7.3. Espectroscopía .....	45
<b>1.8. ESPECTROSCOPIA .....</b>	<b>46</b>
1.8.1. Fundamentos físicos de la espectroscopía .....	46
1.8.1.1. Propiedades del átomo .....	46
1.8.1.2. Absorción de energía y precesión .....	48
1.8.1.3. Desplazamiento químico .....	50
1.8.1.4. Constante de acoplamiento espín-espín .....	54
1.8.1.5. Transformación espectroscópica de Fourier .....	54
1.8.2. Técnica espectroscópica .....	55
1.8.2.1. Tipo de secuencias: PRESS y STEAM .....	55
1.8.2.2. Vóxel único o multivóxel .....	57
1.8.2.3. Tiempo de Eco .....	58
1.8.3. Análisis de un espectro y metabolitos .....	59
1.8.4. Aplicaciones clínicas .....	61
1.8.4.1. Espectroscopía testicular .....	63
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>71</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS .....</b>	<b>75</b>



<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	79
<b>5.1. MATERIAL</b> .....	79
<b>5.2. MÉTODOS</b> .....	79
5.2.1. Consulta a urología .....	79
5.2.2. Pruebas de imagen .....	80
5.2.3. Evaluación de las imágenes .....	82
5.2.3.1. Valoración de la espectroscopía .....	82
5.2.3.2. Valoración del volumen .....	84
<b>5.3. DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDAD</b> .....	84
<b>5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	85
5.4.1. Características de los pacientes y testículos .....	86
5.4.2. Volumen testicular .....	86
5.4.3. Valores espectroscópicos .....	88
5.4.4. Espermograma .....	89
<b>6. RESULTADOS</b> .....	93
<b>6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES</b> .....	93
<b>6.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS TESTÍCULOS</b> .....	95
<b>6.3. VOLUMEN TESTICULAR</b> .....	97
6.3.1. Descripción del volumen testicular .....	97
6.3.2. Comparación del volumen de los dos testículos .....	98
6.3.3. Comparación de los métodos de estimación del volumen .....	100
6.3.4. Relación del volumen testicular con otras variables .....	102
6.3.5. Curva ROC del volumen testicular .....	105
<b>6.4. ESPECTROSCOPIA</b> .....	106
6.4.1. Descripción de colina, lípidos y creatina .....	106
6.4.2. Relación de los valores espectroscópicos con el volumen testicular .....	107
6.4.3. Relación de los valores espectroscópicos con variables de diagnóstico .....	108
6.4.3.1. Patología testicular en RM .....	108
6.4.3.2. Infertilidad del paciente .....	110
6.4.4. Capacidad diagnóstica de los valores espectroscópicos .....	112

6.4.4.1. Patología testicular en RM .....	112
6.4.4.2. Infertilidad del paciente .....	113
<b>6.5. ESPERMIOGRAMA .....</b>	<b>115</b>
<b>6.6. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>115</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Tasa acumulada de embarazo en la población fértil después de dos años .....	6
<b>Tabla 2.</b>	Duración del ciclo de la espermatogénesis .....	19
<b>Tabla 3.</b>	Endocrinopatías genéticas que causan infertilidad masculina .....	24
<b>Tabla 4.</b>	Anomalías cromosómicas que causan infertilidad masculina .....	25
<b>Tabla 5.</b>	Factores con influencia negativa sobre la espermatogénesis .....	28
<b>Tabla 6.</b>	Diferentes causas que condicionan trastornos de la eyaculación .....	29
<b>Tabla 7.</b>	Valores de referencia de la OMS para la caracterización del semen humano .....	32
<b>Tabla 8.</b>	Factores de riesgo para el desarrollo de anticuerpos antiespermatozoides .....	38
<b>Tabla 9.</b>	Pruebas de fertilidad del esperma .....	39
<b>Tabla 10.</b>	Indicaciones ecográficas .....	42
<b>Tabla 11.</b>	Desplazamiento químico de los principales compuestos que se pueden detectar en los diferentes tejidos mediante ERM-1H .....	60
<b>Tabla 12.</b>	Variables a estudio .....	85
<b>Tabla 13.</b>	Características de los pacientes .....	94
<b>Tabla 14.</b>	Distribución, por grupos de edad, de la clasificación de la infertilidad y sus causas .....	95
<b>Tabla 15.</b>	Porcentaje de infertilidad según motivo de consulta y antecedentes urológicos .....	95
<b>Tabla 16.</b>	Características de los testículos .....	96

<b>Tabla 17.</b> Estadísticos descriptivos del volumen testicular (derecho, izquierdo y ambos) estimado con los dos métodos. DE: desviación estándar y rango .....	97
<b>Tabla 18.</b> Coeficientes del modelo de regresión GEE entre el volumen testicular, por los dos métodos, y la edad y el IMC, con su intervalo de confianza del 95% y la significación (valor p) .....	102
<b>Tabla 19.</b> Volumen testicular, por los dos métodos, en función del grupo de edad, el sobrepeso, la posible infertilidad y el diagnóstico final urológico de los pacientes. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) .....	103
<b>Tabla 20.</b> Volumen testicular, por los dos métodos, en función de la presencia de patología testicular en RM y la infertilidad según curva espectroscópica. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) .....	104
<b>Tabla 21.</b> Área bajo la curva ROC del volumen testicular .....	105
<b>Tabla 22.</b> Estadísticos descriptivos de los picos de colina, lípidos y creatina en función .....	107
<b>Tabla 23.</b> Coeficientes del modelo de regresión GEE entre los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía y el volumen testicular, por los dos métodos, con su intervalo de confianza del 95% y la significación (valor p) .....	108
<b>Tabla 24.</b> Valores de los metabolitos en función de la presencia de patología testicular en RM. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y p (U de Mann-Whitney para datos correlacionados .....	109
<b>Tabla 25.</b> Valores de los metabolitos en función de la presencia de infertilidad DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y p (U de Mann-Whitney para datos correlacionados) .....	111

<b>Tabla 26.</b> Área bajo la curva ROC (AUC) e intervalo de confianza del 95% para la colina y la razón colina/lípidos como marcador de patología testicular en RM .....	112
<b>Tabla 27.</b> Área bajo la curva ROC (AUC) e intervalo de confianza del 95% para la colina y la razón colina/lípidos como marcadores de diagnóstico de infertilidad del paciente .....	113
<b>Tabla 28.</b> Valores de la colina, creatina y lípidos según la presencia de oligospermia y comparación de mediana mediante el test de Mann Whitney para datos correlacionados .....	115
<b>Tabla 29.</b> Resumen de los valores de la curva ROC según la variable patología testicular en RM .....	115
<b>Tabla 30.</b> Resumen de los valores de la curva ROC según la presencia de infertilidad .....	116



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representación del microscopio de <i>Van Leeuwenhoek</i> .....	4
<b>Figura 2a.</b>	Los espermatozoides por <i>Leeuwenhoek</i> publicado en <i>Philosophical Transactions</i> , 1678 .....	5
<b>Figura 2b.</b>	El homúnculo preformado en el espermatozoide. Tratado de <i>Leeuwenhoek</i> , 1690 donde afirman que el feto no se hallaba preformado en el huevo, sino en el espermatozoide, y que el huevo sólo desempeñaba un simple papel nutricional .....	5
<b>Figura 3.</b>	Distribución de las causas de infertilidad .....	7
<b>Figura 4.</b>	Tasa de embarazo y de aborto por ciclo menstrual según la edad de la mujer .....	9
<b>Figura 5.</b>	Abordaje de la infertilidad desde la SEF .....	10
<b>Figura 6.</b>	Anatomía del aparato reproductor masculino .....	11
<b>Figura 7a.</b>	Representación anatómica del testículo .....	12
<b>Figura 7b.</b>	Sección histológica del testículo .....	12
<b>Figura 7c.</b>	Representación microscópica del lobulillo testicular en tinción hematoxilina-eosina .....	13
<b>Figura 7d.</b>	Representación microscópica de un túbulo seminífero en tinción hematoxilina eosina .....	13
<b>Figura 7e.</b>	Sección de un túbulo representando las células de Leydig y Sertoli .....	13
<b>Figura 8.</b>	Ilustración del proceso de la espermatogénesis, proceso por el cual las células germinales localizadas en la lámina basal de los túbulos seminíferos sufren divisiones y diferenciaciones que culminan con la formación de espermatozoides maduros .....	17
<b>Figura 9.</b>	Fases de la espermatogénesis .....	18



<b>Figura 10.</b>	Células y soporte mecánico para el desarrollo de la espermatogénesis .....	19
<b>Figura 11.</b>	Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y esquema de la función endocrina testicular .....	21
<b>Figura 12.</b>	Esquema del cromosoma Y y de las regiones AZFa, AZFb, AZFc .....	22
<b>Figura 13.</b>	Indicación de Bioquímica seminal .....	37
<b>Figura 14.</b>	Aglutinación espermática .....	38
<b>Figura 15.</b>	Movimiento sinusoidal y trayecto del espermatozoide .....	40
<b>Figura 16.</b>	Anatomía del testículo en ecografía .....	44
<b>Figura 17.</b>	Imagen de RM es secuencia potenciada en TSE-T2 y plano coronal que muestra el parénquima testicular, la túnica y la cabeza del epidídimo .....	45
<b>Figura 18.</b>	Posición de los espines bajo la influencia de un campo magnético .....	47
<b>Figura 19.</b>	Influencia del campo magnético en el estado de los espines .....	48
<b>Figura 20.</b>	En un campo magnético el vector del espín precesiona en torno al campo magnético (eje z). Las componentes en el plano x-y varían con el tiempo a la frecuencia $B_0$ llamada frecuencia de resonancia de Larmor ( $\omega$ ) .....	49
<b>Figura 21a.</b>	Estructura molecular del lactato .....	51
<b>Figura 21b.</b>	Estructura molecular de la colina. Los protones de sus grupos metil (CH <sub>3</sub> ) sufren menor apantallamiento que los del lactato por la mayor electronegatividad del N central .....	51
<b>Figura 22.</b>	Espectro en el que se identifica la diferente posición de un <sup>1</sup> H incluido en un grupo metil del lactato (Lact) respecto otro incluido en la molécula de colina (col) .....	51
<b>Figura 23.</b>	Escala típica del desplazamiento químico <sup>1</sup> H para diferentes grupos funcionales. La resonancia del H <sub>2</sub> O y la resonancia del TMS se sitúan a 4.7 y 0 ppm respectivamente .....	53

<b>Figura 24.</b>	Representación de una espectroscopía .....	54
<b>Figura 25.</b>	Proceso de formación del espectro. Espectros obtenidos mediante un programa específico que permite simular espectros (programa jMRUI). La figura 25e muestra una FID que sería la resultante de la suma de las FIDs mostradas en 25a y 25c. Al realizar la transformada de Fourier (TF) de esta FID obtenemos la figura 25f (suma de las figuras 25b y 25d) que nos da una representación del espectro según la cantidad de señal a cada frecuencia y su intensidad relativa .....	55
<b>Figura 26.</b>	Representación del tipo de secuencias comúnmente utilizadas en espectroscopía vóxel único. La localización espacial se obtiene agrupando las ortogonales (a). La secuencia STEAM consiste en tres pulsos selectivos de 90° (b) , la secuencia PRESS consiste en un pulso de 90° seguido de dos pulsos de 180° (c) .....	56
<b>Figura 27.</b>	Representación de un vóxel único y multivóxel en el estudio del parénquima testicular .....	58
<b>Figura 28.</b>	Representación de los valores espectroscópicos encontrados en el parénquima testicular sano: colina, creatina y lípidos .....	64
<b>Figura 29.</b>	Disminución drástica de los valores de colina secundario a la presencia de patología testicular .....	64
<b>Figura 30.</b>	Protocolo de RM realizado en nuestro estudio .....	80
<b>Figura 31.</b>	Representación de una secuencia espectroscópica univóxel, se coloca una única caja en el parénquima testicular en los tres planos del espacio, y secuencia multivóxel que permite el estudio de todo el parénquima .....	82
<b>Figura 32.</b>	Representación de una curva de espectroscopía. El eje "y" permite cuantificar el pico del metabolito y el eje "x" identificarlo .....	83
<b>Figura 33.</b>	Representación de la cuantificación del volumen con los dos métodos, a través de la fórmula propuesta de Lambert .....	84

<b>Figura 34.</b>	Representación del volumen a través de la segmentación RM (área en cada plano para calcular un volumen total) .....	84
<b>Figura 35.</b>	Distribución del motivo de consulta al urólogo por grupo de edad .....	93
<b>Figura 36.</b>	Distribución del volumen testicular (derecho, izquierdo y ambos) estimado con ambos métodos.....	98
<b>Figura 37.</b>	Distribución de la diferencia de volumen entre el testículo derecho y el testículo izquierdo según el método de estimación .....	99
<b>Figura 38a.</b>	Diagrama de dispersión del volumen testicular derecho frente al volumen testicular izquierdo estimado con el método de segmentación, y recta de regresión ajustada .....	99
<b>Figura 38b.</b>	Diagrama de dispersión del volumen testicular derecho frente al volumen testicular izquierdo estimados con el método de Prader, y recta de regresión ajustada .....	100
<b>Figura 39.</b>	Distribución del volumen testicular estimado con los dos métodos ....	100
<b>Figura 40.</b>	Análisis gráfico de la concordancia entre los dos métodos de estimación del volumen testicular .....	101
<b>Figura 41.</b>	Error relativo del método de segmentación con respecto al método de Lambert para estimar el volumen testicular .....	102
<b>Figura 42.</b>	Distribución del volumen testicular con ambos métodos según la clasificación de la infertilidad .....	103
<b>Figura 43.</b>	Volumen testicular, por los dos métodos, en función de la presencia de patología en RM .....	104
<b>Figura 44.</b>	Curva ROC del volumen testicular con el método de segmentación y Lambert .....	105
<b>Figura 45.</b>	Distribución de los valores de la curva de espectroscopía: colina, lípidos, creatina .....	106
<b>Figura 46.</b>	Distribución de las razones colina +creatina/lípidos y colina/lípidos ..	107

<b>Figura 47.</b>	Distribución de los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía en función de la presencia de patología testicular en RM ...	109
<b>Figura 48.</b>	Distribución de los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía en función de la presencia de infertilidad .....	111
<b>Figura 49.</b>	Curva ROC empírica de colina como marcador de patología testicular en RM, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte .....	112
<b>Figura 50.</b>	Curva ROC empírica de la razón colina/lípidos como marcador de patología testicular en RM, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte .....	113
<b>Figura 51.</b>	Curva ROC empírica de colina como marcador de infertilidad del paciente, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte .....	114
<b>Figura 52.</b>	Curva ROC empírica de la razón colina/lípidos como marcador de infertilidad del paciente, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte .....	114
<b>Figura 53.</b>	Tabla de los valores de colina recogida del artículo de Glunde .....	125
<b>Figura 54.</b>	Representación de las curvas espectroscópicas de un paciente con infertilidad secundaria a un hipogonadismo hipogonadotrópico donde se observa una disminución de la concentración de colina al existir una disminución de la espermatogénesis testicular .....	128
<b>Figura 55.</b>	Representación de una curva espectroscópica normal en un paciente diagnosticado de infertilidad por azoospermia obstructiva .....	129



# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AZF</b> .....	Factor de azospermia
<b>CBAVD</b> .....	Ausencia congénita bilateral de conductos deferentes
<b>CFTR</b> .....	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<b>Co</b> .....	Colina
<b>Cr</b> .....	Creatina
<b>DS</b> .....	Desviación estándar
<b>ERM</b> .....	Espectroscopia por resonancia magnética
<b>ERM<sup>1</sup>H</b> .....	Espectroscopia por resonancia magnética de protón
<b>ESHRE</b> .....	Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana
<b>ETS</b> .....	Enfermedades de transmisión sexual.
<b>FIV</b> .....	Fecundación <i>in vitro</i>
<b>FOV</b> .....	Campo de visión (Field of view)
<b>FSH</b> .....	Hormona estimulante del folículo
<b>GEE</b> .....	Ecuaciones generales estimadas
<b>GRE</b> .....	Gradiente eco
<b>GnRH</b> .....	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>HHG</b> .....	Hipotálamo hipofisario gonadal
<b>ICSI</b> .....	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)
<b>IMC</b> .....	Índice de masa corporal
<b>LH</b> .....	Hormona luteinizante
<b>Lip 1.3</b> .....	Componente de los lípidos debido al grupo metileno

**OMS** ..... Organización Mundial de la Salud

**PRESS** ..... Point Resolved Spectroscopy

**RM** ..... Resonancia magnética

**ROC** ..... Receiver Operating Characteristic

**SEF** ..... Sociedad española de fertilidad

**SRY** ..... Sex-determining Region Y

**STEAM** ..... Stimulated Echo Acquisition Mode

**TC** ..... Tomografía computerizada

**TE** ..... Tiempo de eco

**TSE** ..... Turbo espín eco

**TMS** ..... Tetrametilsilano

**VOI** ..... Volume of interest

$\sigma$  ..... Constante de apantallamiento

$\gamma$  ..... Constante giromagnética

## **ÍNDICE DE TERMINOLOGÍA**

<b>Aspermia</b>	Ausencia de eyaculado externo.
<b>Astenospermia</b>	Disminución del porcentaje de espermatozoides móviles
<b>Astenozoospermia</b>	Reducción de motilidad de los espermatozoides
<b>Azospermia</b>	Carencia considerable de espermatozoides en el semen.
<b>Hipospermia</b>	Un volumen inferior a 2 ml
<b>Hiperespermia</b>	Un volumen superior a 6 ml
<b>Necroespermia</b>	Tasa de espermatozoides muertos elevada
<b>Oligozoospermia</b>	Si el recuento es inferior a 20 millones/ml.
<b>Polizoospermia.</b>	Si la concentración es superior a 200 millones/ml.
<b>Teratozoospermia</b>	Menos del 50 % de espermatozoides con morfología normal.





# UTILIDAD DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA TESTICULAR CON ESPECTROSCOPIA EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA INFERTILIDAD

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La infertilidad es un problema de salud complejo y con un elevado impacto psicosocial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) cree que hay entre 60-80 millones de parejas infértiles en el mundo, mientras que, en España, más de 860.000 parejas españolas la padecen y el problema crece a un ritmo de 16.000 nuevos casos por año. Es una entidad que presenta gran dificultad para su prevención, diagnóstico y tratamiento; en gran parte debido a que la mayoría de los métodos para estudiarla son poco específicos.

**OBJETIVOS:** Evaluar el papel de la espectroscopía por resonancia magnética (<sup>1</sup>H-ERM) en el diagnóstico de la infertilidad. Determinar los valores normales de los posibles metabolitos implicados en la espermatogénesis (colina, creatina y lípidos) y cuantificar la infertilidad, así como definir sus causas a través de la combinación de los mismos.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** El estudio incluyó a 27 pacientes que acudieron a la consulta de urología, 24 con problemas de fertilidad y 3 pacientes sanos. En total, se estudiaron de forma prospectiva 50 testículos mediante 1,5 RM con secuencias morfológicas y <sup>1</sup>H-ERM. Se han analizado las variables: volumen testicular mediante el método de Lambert y segmentación, la presencia de patología testicular en RM, infertilidad; así como los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía: colina, creatina, lípidos y la razón colina/lípidos. Todos los valores se expresan con media y desviación estándar. La capacidad predictiva de las diferentes variables se ha valorado a partir de la estimación de las áreas bajo las correspondientes curvas ROC.

**RESULTADOS:** El volumen testicular medio obtenido por el método de Lambert es de (25,3 ±9,2 cm<sup>3</sup>) y por el método de segmentación (18,1 ±7,6 cm<sup>3</sup>). El método de Lambert sobrestima sistemáticamente los valores obtenidos comparado con el método de segmentación. El volumen testicular permite diferenciar entre testículos sanos de enfermos con una sensibilidad y especificidad del 72.2% cuando se establece como punto de corte un valor de 16,4 cm<sup>3</sup> para el método de segmentación y del 71.9% con

la fórmula de Lambert con un valor de punto de corte de 22,5 cm<sup>3</sup>. En relación a los metabolitos detectados en espectroscopía, se obtuvieron unos valores medios de colina, lípidos y creatina de (0,91 ±0,62), (1,47 ±1,42) y (0,40 ± 0,27) respectivamente y del ratio colina/lípidos de (0,80 ±0,5). Los valores de colina presentan una relación estadísticamente significativa con el volumen testicular con una p de 0,001. Los valores de colina para la infertilidad de causa pretesticular y testicular son de (0,09 ±0,001) y (0,60 ±0,54) respectivamente y para las causas post-testiculares de (1,16 ±0,41). La colina y la razón colina/lípidos permiten discriminar tanto los testículos sanos de los enfermos como la presencia de infertilidad. El área bajo la curva ROC para la colina y para la razón colina/lípidos es de 0,9 y de 0,83 cuando se analiza la presencia de patología testicular en RM. Para la variable infertilidad, el área bajo la curva es de 0,763 para la colina y de 0,70 para la razón colina/lípidos. Los valores encontrados de creatina y lípidos no permiten discriminar ni la presencia de infertilidad ni de patología testicular en RM. En conclusión, podemos considerar que los valores de colina inferiores a 0,65 detectan patología testicular en RM con una sensibilidad y especificidad del 80%. Asimismo, valores inferiores a 1,17 detectan la presencia de infertilidad en los pacientes con una sensibilidad y especificidad del 75%.

**CONCLUSIONES:** La resonancia magnética con técnica espectroscópica permite identificar la infertilidad masculina y cuantificar la actividad espermatogénica. Los valores de colina discriminan con una elevada sensibilidad y especificidad la presencia tanto de infertilidad como de patología testicular. Las diferencias obtenidas en los valores medios de colina permiten clasificar la infertilidad en pretesticular, testicular y post-testicular. La presencia de picos de colina permiten diferenciar entre las azoospermias obstructivas y no obstructivas, evitando así la realización de biopsias innecesarias. Se pueden obtener mapas de actividad metabólica (mapas de colina) para identificar el punto de mayor actividad espermatogénica, para poder realizar una biopsia dirigida.

# USEFULNESS OF TESTICULAR MAGNETIC RESONANCE WITH SPECTROSCOPY FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF INFERTILITY

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Infertility is a global health problem with high and complex psychosocial impact. The World Health Organization (WHO) estimates between 60-80 million infertile couples in the world. In Spain more than 860,000 Spanish couples suffer from it, growing at a rate of 16,000 new cases per year. Infertility is an entity with high difficulty and complexity for prevention, diagnosis and treatment, in part because most methods for study are not specific.

**PURPOSE:** To determine the role of MRI and MR spectroscopy (MRSI) in the diagnosis of infertility. To establish normal values of the metabolites involved in the spermatogenesis (choline, creatine, and lipids) and to quantify the infertility and describe their causes by combining these values.

**MATERIAL AND METHODS:** This study included 27 consecutive patients attending the urologist 24 with fertility problems and 3 healthy patients. A total of 50 testes were evaluated at 1.5T magnetic resonance. Standard MRI examination and spectroscopy were performed. The variables: testicular volume measured, using the empiric formula of Lambert and by the voxel-count method, the presence of testicular pathology on MRI, infertility, values of metabolites detected by spectroscopy: choline, creatine, lipids and choline/lipids ratio were analyzed. All parameters were expressed as mean±standard deviation. Predictive capacity of different variables has been evaluated from the estimated areas under the ROC (Receiver Operating Characteristic) curves.

**RESULTS:** The mean testicular volume measured by the empiric formula of Lambert was  $(25.3 \pm 9.2 \text{ cm}^3) \text{ cm}^3$  and  $(18.1 \pm 7.6 \text{ cm}^3)$  by the “voxel-count method”. Lambert’s Formula calculated values systematically overestimated the volume compared with the “voxel-count method”. Testicular volume led us to discriminate between healthy

and pathological testes with a sensitivity and specificity of 72.2% with a cut-off point of 16.4 cm<sup>3</sup> for “voxel-count method” and 71.5 with Lambert’s formula with a cut-off point of 22.5 cm<sup>3</sup>. Regarding spectroscopy detected metabolites, mean values of choline, lipids and creatine were respectively (0.91 ±0.62), (1.47 ±1.42) y (0.40 ± 0.27). Meanwhile (0.80 ±0.5) value for choline/lipids ratio. There was a statistically significant relationship between choline value and testicular volume (p=0.001). Mean values of choline for pretesticular and testicular infertility were (0.09 ±0.001) and (0.60 ±0.54) respectively and for posttesticular causes: (1,16 ±0,41). Choline and choline / lipids ratio were able to discriminate between healthy and diseased testes and presence/absence of infertility in patients. The area under ROC curves for choline and choline / lipids ratio was 0.9 and 0.83 respectively when presence of testicular pathology was analyzed by MRI. For the variable “infertility”, the area under the curve was 0.763 for choline and 0.70 for choline / lipids ratio. Creatine and lipids values have not been sufficient to discriminate between presence/absence of infertility or testicular pathology on MRI. In conclusion, values of choline bellow 0.65 can depict testicular pathology with a sensibility and specificity of 80 % and values of choline bellow 1.17 can detect infertility patients with a sensibility and specificity of 75%.

**CONCLUSIONS:** Magnetic resonance spectroscopic technique allows us to identify the diseases and risk factors for male infertility or those that contribute to it, allowing a quantification of spermatogenic activity. Choline values discriminate with high sensitivity and specificity both, presence of infertility and testicular pathology. Due to the differences obtained in the mean values of choline, we can obtain information about infertility classification as pre-testicular, testicular or post-testicular. Presence of different choline peaks between obstructive and non-obstructive azoospermias, avoid unnecessary biopsies. Also, we can build maps of metabolic activity (maps of choline) to identify the localization of highest spermatogenic activity and perform targeted biopsy.

## **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. DEFINICIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas. El concepto de tiempo razonable es discutible. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992a) así como la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE, 1996) en sus recomendaciones mencionan un plazo mínimo de dos años para desarrollar el embarazo. Si éste no ocurre después de ese tiempo, la pareja es considerada infértil (1,2). Desde un punto de vista práctico, la mayoría de los médicos inician los estudios de una pareja infértil después de un año de haber fracasado los intentos de embarazo. Además, debido al impacto de la edad sobre la fertilidad, cuando una mujer tiene más de 39 años, podría ser aconsejable comenzar el estudio aunque sólo hayan transcurrido seis meses de intentos fracasados.

En consecuencia, no se justifican límites estrictos para comenzar un estudio de una pareja infértil, dado que el tiempo de espera debería estar relacionado con múltiples factores como la edad de la mujer, los antecedentes de alteraciones que afectan la fertilidad, los deseos de la pareja, etc.

La infertilidad se clasifica en dos categorías:

- **Infertilidad primaria** cuando no ha habido embarazo después de un mínimo de 12 meses de actividad sexual regular sin el uso de anticonceptivos.
- **Infertilidad secundaria** cuando las parejas han estado embarazadas al menos una vez, pero nunca después.

Es importante no confundir los términos infertilidad con esterilidad. Este último concepto se ha modificado gracias a la posibilidad de obtener espermatozoides intratesticulares e intraepididimarios, por lo que el empleo del mismo se reserva exclusivamente para la incapacidad total y definitiva de concebir como consecuencia de una etiología evidente y no curable de infertilidad (un ejemplo de ello es la orquiectomía bilateral).



## INTRODUCCIÓN

La ESHRE con objeto de unificar criterios estableció las siguientes definiciones (2):

- **Fertilidad:** capacidad para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito.
- **Infertilidad:** incapacidad de la pareja para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito.
- **Subfertilidad:** capacidad para conseguir embarazo sin ayuda médica pero en un periodo superior a un año.
- **Fecundabilidad:** probabilidad de conseguir un embarazo durante un ciclo menstrual.
- **Fecundidad:** capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito.

### 1.2. HISTORIA

La historia de la infertilidad discurre paralela a la historia de la humanidad. Muy tempranamente aparece en el libro de Génesis, el primero de la Biblia, el relato del primer caso registrado, Abraham y Sara, una pareja que llegó a la ancianidad sin haber conseguido la procreación (*Génesis 16:1-3:*). En aquella época si los integrantes de una pareja no tenían hijos legítimos, podían hacer lo mismo que hicieron Abraham y Sara, “adquirir” una segunda mujer, o bien adoptar a un esclavo que ya los sirviera, quien cuidaría de ellos mientras viviesen y después velaría por su sepultura. En recompensa, recibía la herencia. Si -en el *ínterin*- nacían hijos legítimos, estos se quedarían con la mayor parte de la herencia, pero el ilegítimo o el adoptivo continuaría teniendo el derecho a una parte.

En la Época Antigua, la ausencia de descendencia de una pareja era sinónimo de infertilidad femenina, siendo entonces la mujer despreciada y repudiada por su esposo y por toda la sociedad. La noción de infertilidad masculina sólo fue considerada cuando la mujer progresó en su papel social y la pareja fue considerada como la mínima unidad social.

Las primeras disquisiciones sobre el origen del poder procreador del hombre provienen de los sumerios. Atribuían a la saliva, vehículo del soplo de la vida, un poder procreador a la vez material y mágico. En la Grecia Antigua, Galeno estudió los

testículos, preconizó que el semen procedía del filtrado de la sangre y que un hombre podía eyacular sin ser fértil (3). Galeno consideró que la fertilidad estaba sujeta a la aparición de los caracteres sexuales secundarios, lo que constituye la primera descripción de las dos funciones principales de los testículos: la endocrina y la procreadora. La relación entre la ausencia de testículos y la infertilidad fue reconocida por el empleo, a lo largo de toda la Historia, de los *eunucos* como guardianes de harenes o de alcoba, especialmente en Oriente Medio y China.

Desde la antigüedad, se han promulgado diversas teorías para explicar el mecanismo de la procreación, muchas de ellas son expresadas en forma de mitos y leyendas. Un ejemplo de ello aparece en el Taoísmo, implantado en China desde hace más de dos mil años. En esta doctrina, basada en el equilibrio entre el *Yang* (fuerzas positivas) y el *Yin* (fuerzas negativas), la secreción de la mujer se considera como el Yin y el semen como el Yang. Su unión se produce durante el coito, lo que capacita a la “semilla” masculina para entrar en la mujer y transformarse en el feto. Hipócrates describió esa semilla como el “jugo de todas las partes del cuerpo”, que procediendo de la médula espinal, pasaría por los riñones y los testículos hasta llegar al pene. La mujer también produciría también una semilla, pero considerada más débil, por lo que ambos padres aportarían una parte a la formación de un nuevo ser. El placer sexual era necesario para que todas las partes del cuerpo participaran del coito y, sólo cuando los dos “líquidos seminales” se encontraban en determinadas cantidades, se formaba el feto (4). Aristóteles sostenía que el feto se desarrollaba a partir del semen paterno y de la sangre menstrual materna y para Galeno, se formaba a partir de la mezcla de semillas del padre y de la madre, para nutrirse en el seno del útero materno con la sangre menstrual.

Desde la época clásica hasta el siglo XVII estas teorías permanecen inalteradas en gran parte debido a la represión de la Iglesia y a la falta de investigaciones importantes. Posteriormente se crearon dos corrientes de pensamiento. Aquellos que creían que había dos semillas y los que creían en una única. Descartes fue el máximo impulsor de la teoría de las dos semillas, y se vio respaldado por Harvey (1651), que publicó trabajos sobre como el semen fecunda a todo el cuerpo de la mujer pero sólo el útero puede desarrollar al feto, y por los estudios de Graaf (1672) que describió con detalle el mecanismo de producción del óvulo y su fecundación en la trompa de Falopio (5).

## INTRODUCCIÓN

La originalidad de Harvey reside en el hecho de que adapta el modelo de los animales ovíparos a los mamíferos. El gallo, según Harvey, introduce en la gallina el "principio fecundante", que no es más que un elemento secundario de la procreación. La gallina una vez recibido este componente, puede producir huevos fecundados, de los que surgirán polluelos parecidos a sus progenitores. Lo mismo ocurre en los mamíferos: el semen masculino penetra en el útero en el que, al igual que sucede con el huevo de gallina, crea el "conceptus", del que surge el feto. A pesar de estos errores, el lema de Harvey representa un hito en la historia de la embriología: "El huevo es el origen de todo ser vivo".

El descubrimiento del espermatozoide es contemporáneo al del óvulo, segunda mitad del siglo XVII, y se debió principalmente al invento de Antonie van Leeuwenhoek: el microscopio (Fig.1).

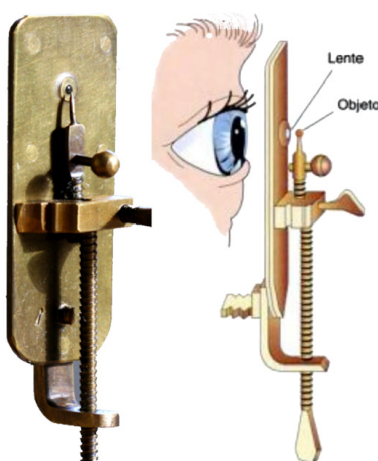


Figura 1. Representación del microscopio de *Antonie van Leeuwenhoek*.

Así pues, según Leeuwenhoek, la fuente de la vida no sería el estático huevo sino los móviles espermatozoides (**teoría animalculística**). Éste, en una carta dirigida a la *Royal Society of London* en 1677, describía así lo que había observado en el espermatozoide humano inmediatamente después de la emisión: "He visto una tal multitud de animalculos viviendo en él, que más de 1.000 se movían en el espacio de un grano de arena (...) Estos animalculos eran más pequeños que los glóbulos rojos de la sangre. Tenían cuerpos redondeados, romos en la parte anterior, terminados en punta en la posterior, y estaban dotados de una cola que tenía cinco o seis veces la longitud del

cuerpo. Avanzaban mediante un movimiento serpentiforme de la cola, nadando como una anguila." (6).

Leeuwenhoek lo llamó “animálculo”; el término definitivo fue acuñado por Nystens en 1855. No obstante, a pesar del descubrimiento no comprendieron el papel del espermatozoide en la fecundación y creyeron que contenía un ser humano preformado en miniatura que aumentaba de tamaño cuando el espermatozoide penetraba el óvulo (Fig. 2a y 2b).

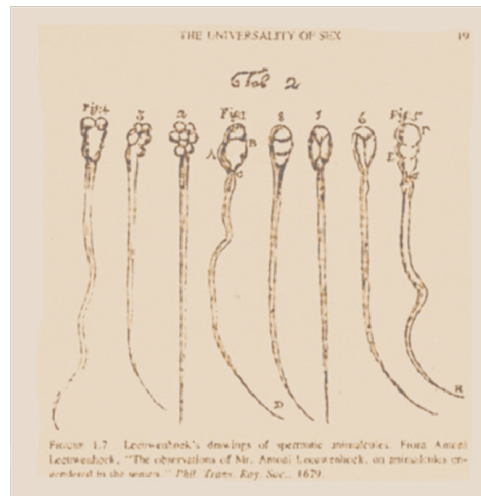


Figura 2a. Los espermatozoides por Leeuwenhoek. Publicado en *Philosophical Transactions*, 1678.



Figura 2b. El homúnculo preformado en el espermatozoide (Tratado de Leeuwenhoek, 1690).

La función definitiva del espermatozoide no fue definitivamente demostrada hasta 1824 con los experimentos de Thumas y Prévost sobre fecundación y, en 1841, Calister demostró que los espermatozoides derivaban de células del testículo (7) .

Aunque es verdad que en las mitologías griega, asiática e incluso en la Biblia, se habla de los testículos masculinos como fuentes de vida, y de que Galeno describe dos posibles funciones del testículo: la producción del semen y la viril o endocrina, no es hasta el siglo XVII, en que Leeuwenhoek descubre el espermatozoide, cuando comienza el verdadero estudio de la infertilidad en el varón. Por lo tanto, tuvieron que transcurrir más de 19 siglos para que el avance de la ciencia médica, durante la segunda mitad del siglo XX, pudiera comenzar a ofrecer soluciones a las parejas afectadas por la infertilidad.

## INTRODUCCIÓN

Desde que P. Steptoe y R. Edwards en 1978, lograron el primer embarazo con técnicas de fecundación in vitro y transferencia de embriones al útero (FIV/TE), la comunidad científica se vio conmovida por la posibilidad de intervenir efectivamente en el proceso reproductivo humano (8,9). Miles de parejas infértiles que hasta ese entonces se veían imposibilitadas para tener hijos, recurrieron a estos procedimientos como un camino real y eficiente hacia la paternidad.

### 1.3. EPIDEMIOLOGÍA, IMPACTO Y FACTORES PRONÓSTICOS.

La infertilidad primaria o secundaria afecta a cerca del 15% de las parejas en los países industrializados (10-12). Tal y como indicábamos, se define fertilidad como la capacidad para conseguir un embarazo tras 1 año de exposición regular al coito. En el ser humano es difícil definir la capacidad reproductiva natural, pues existen diversos factores medioambientales que influyen en la obtención de datos concluyentes (13). Esto ha obligado a estudiar modelos demográficos determinados para establecer el rendimiento reproductivo en la especie humana. Según estos modelos, se establece que, en cada ciclo ovulatorio, las parejas sin problemas de fertilidad y relaciones sexuales regulares y no protegidas, tienen entre un 20-30% de posibilidades de lograr un embarazo (14,15). Si se expone este concepto en una escala de tiempo de concepción en parejas fértiles (Tabla 1); a las parejas con deseo reproductivo se les debe informar de que el 85% de la población general concibe en el primer año, con relaciones sexuales regulares y en ausencia de medidas anticonceptivas, y de las que no conciben en el primer año, la mitad lo harán en el segundo (probabilidad acumulativa del 93%).

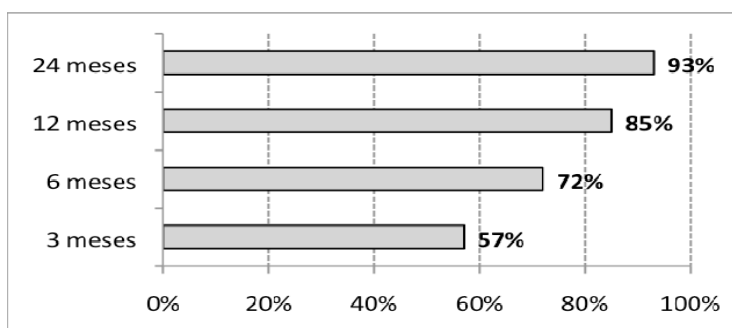


Tabla 1. Tasa acumulada de embarazo en la población fértil después de dos años.

Debemos de considerar que la fertilidad de una pareja depende de las funciones reproductivas coordinadas y combinadas del varón y de la hembra. Los defectos anatómicos, la disfunción de la gametogénesis, las endocrinopatías, las alteraciones inmunológicas, los problemas eyaculatorios y otros factores son causas significativas de alteraciones de la reproducción. Las causas de las alteraciones de la fertilidad radican en un 50% en las mujeres, en un 30% en los varones y en un 20% en ambos (Fig. 3). Se estima que los problemas de fertilidad tienen un origen genético en el 15% de los varones y en el 10% de las mujeres (16). Aunque muchas causas de las alteraciones de fertilidad ahora se pueden determinar en ambos, aproximadamente un 15% todavía recibe un diagnóstico de infertilidad idiopática.

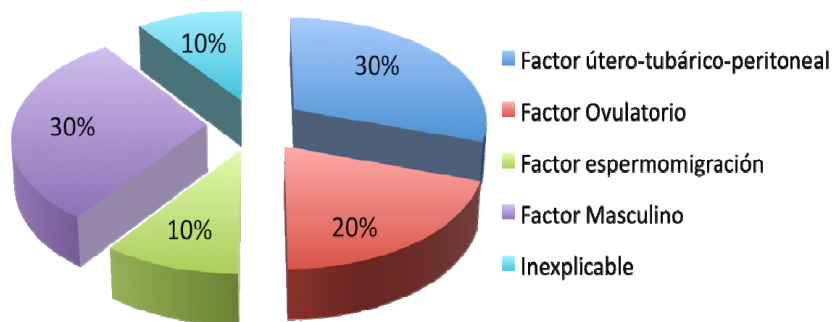


Figura 3. Distribución de las causas de infertilidad.

La OMS estima que hay entre 60-80 millones de parejas infértiles en el mundo, entre un 2-10% de estas parejas son incapaces de concebir un hijo y un 10-25% presentan infertilidad secundaria mundial. En España más de 860.000 parejas la padecen y crece a un ritmo de 16.000 nuevos casos por año (17).

Para la mayoría de las parejas, la incapacidad de tener un hijo es una gran adversidad. La confluencia de expectativas personales, sociales o religiosas aporta una sensación de fracaso y la exclusión de aquellos que son infértiles. Las relaciones entre las parejas pueden llegar a deteriorarse cuando el embarazo no se consigue. Una pareja puede tratar de culpar al otro por ser defectuoso. Por otra parte, la mayoría de las sociedades, especialmente en los países en desarrollo, se organizan de tal manera que los niños son necesarios para la atención y mantenimiento de los padres mayores. Incluso en los países desarrollados con sistemas de apoyo social, se espera que los niños y la familia proporcionen la mayor parte del cuidado de los ancianos.

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad es compleja. Tiene causas y consecuencias múltiples según el género, los antecedentes sexuales, el estilo de vida, la sociedad y los antecedentes culturales de las personas afectadas. Debido a su complejidad y a la dificultad para su prevención, diagnóstico y tratamiento, la infertilidad constituye un problema prominente de salud pública. No hay evidencias provenientes de estudios poblacionales que sugieran una mayor incidencia de parejas infértiles en el momento actual en relación a etapas previas; sin embargo aparentemente en los últimos años sí ha habido un aumento del número de consultas a las clínicas de infertilidad, posiblemente secundario a diversas circunstancias. En primer lugar, uno de los mayores factores que afectan a la concepción es la edad de los progenitores, sobre todo de la mujer. La edad promedio a la cual la mujer desea quedar embarazada ha aumentado considerablemente en las últimas décadas; su educación y participación en diferentes actividades, así como la necesidad de un avance profesional constante, la han llevado a posponer su decisión sobre el embarazo. Esto conlleva que las mujeres desean quedar embarazadas a una edad de aproximadamente 35 años. La disminución de la fertilidad femenina comienza a los 30 años de edad y se hace más pronunciada a los 40 (18). La posibilidad de un embarazo a los 40 años de edad es del 50% del de las mujeres más jóvenes, mientras que la incidencia de abortos espontáneos se duplica o triplica (Fig. 4) (19). Según los excelentes resultados obtenidos mediante la donación de óvulos, el principal efecto que tiene la edad sobre la capacidad reproductiva de las mujeres está casi exclusivamente determinado por la edad del óvulo, dado que la posibilidad del embarazo depende más de la edad de la donante que de quien lo recibe (20). Asimismo, el divorcio y la búsqueda de la estabilidad con las nuevas parejas implican esperar más tiempo antes de tomar la decisión de tener hijos. La edad del varón afecta en menor grado a la capacidad reproductora de la pareja, aunque se demuestra una disminución significativa a partir de los 40 años (21).

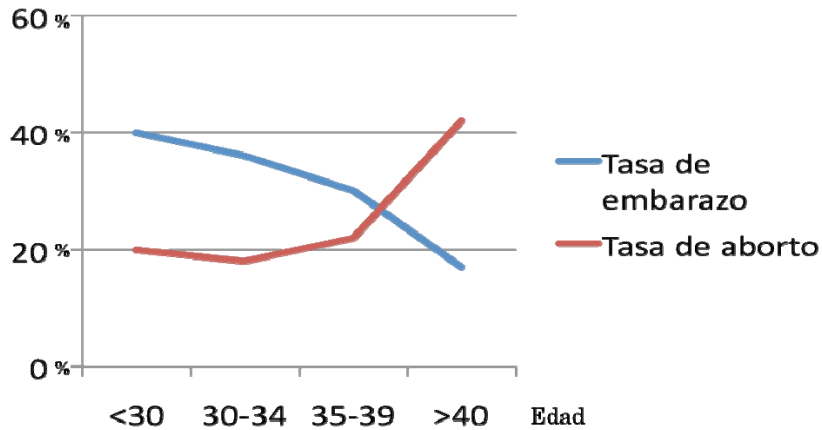


Figura 4. Tasa de embarazo y de aborto por ciclo menstrual según la edad de la mujer.

En segundo lugar, las alteraciones en la calidad del semen pueden incidir sobre la necesidad de consultar por infertilidad. Existen evidencias que muestran que hábitos como el tabaquismo y el abuso del alcohol son nocivos para la calidad del semen; este último, por ejemplo, ha sido relacionado con una reducción de la síntesis y secreción de testosterona y una espermatogénesis anormal. El abuso de tabaco lleva a alteraciones del espermiograma (22).

En tercer lugar, ha habido cambios en la conducta sexual, como un aumento de la frecuencia de las relaciones y del número de las parejas sexuales. Además de la decisión de retrasar el embarazo, el uso de métodos anticonceptivos (no necesariamente preservativos) expone a las parejas a una mayor incidencia de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) que pueden causar consecuencias sobre la fertilidad (23).

Finalmente, la eliminación de la mayoría de los tabúes sobre la fertilidad, la mayor difusión de los estudios existentes y de los tratamientos disponibles, lleva a una mayor frecuencia de consultas médicas por parte de las parejas. Según los datos procedentes del Registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), España es uno de los países europeos con más tratamientos de reproducción asistida, realizándose en el 2006, 50.299 tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) y técnicas afines y 29.766 de inseminación artificial, lo que sitúa al país tan sólo por detrás de Francia y Alemania (Fig. 5).



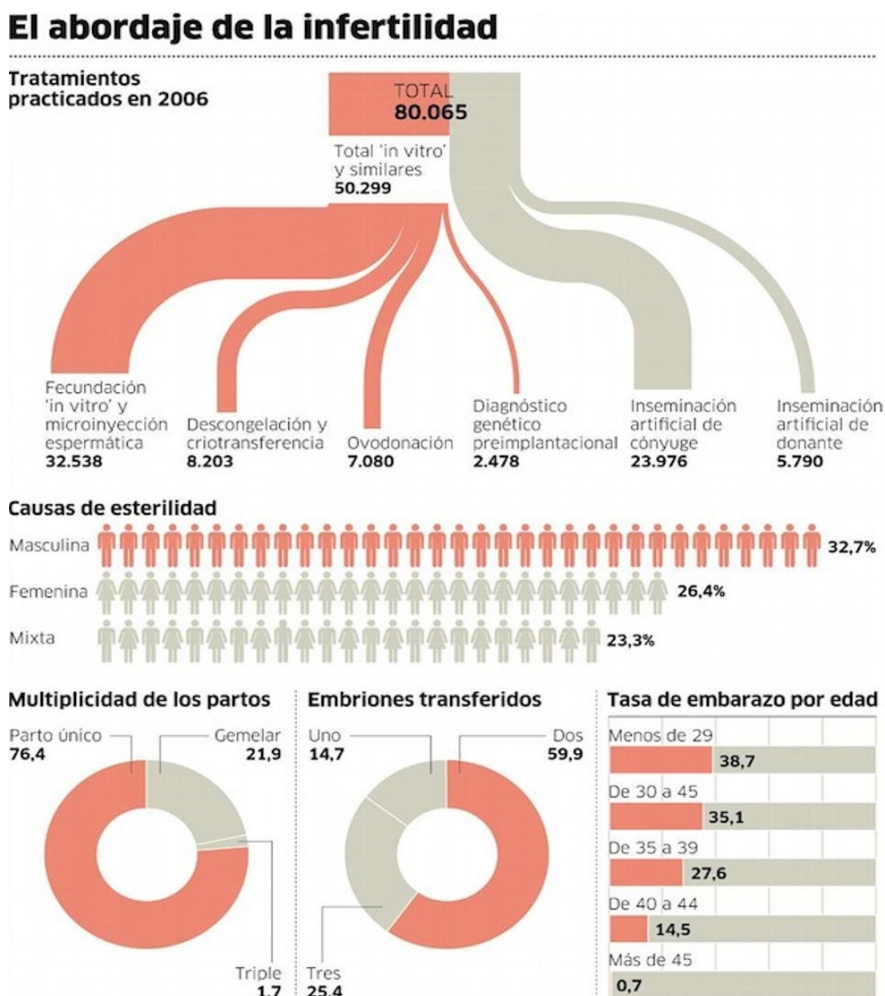


Figura 5. Abordaje de la infertilidad y tratamientos practicados en 2006 en España. Registro de la sociedad española de fertilidad

#### 1.4. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR

El aparato genital masculino está formado por órganos externos, los testículos, el escroto y el pene; y por órganos internos, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. Estos tres últimos son los encargados de fabricar el líquido seminal que acompaña a los espermatozoides producidos por los testículos. La anatomía del aparato reproductor se representa en la Figura 6.

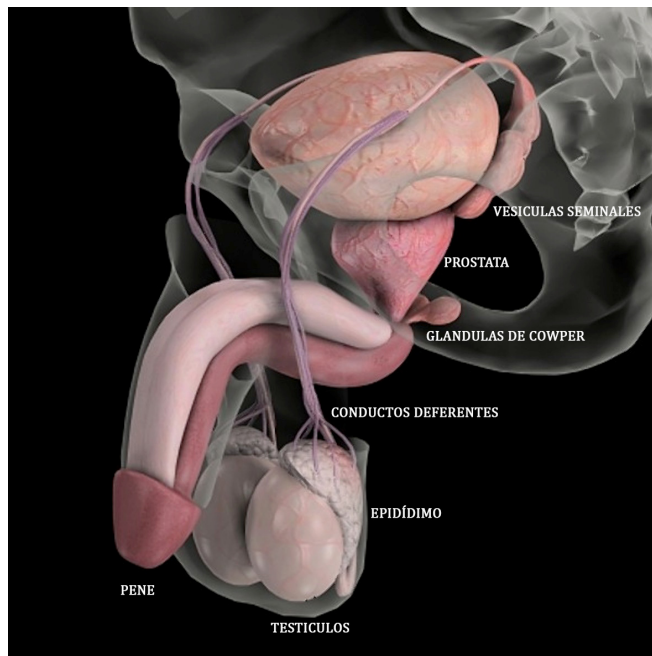


Figura 6. Anatomía del sistema reproductor masculino

#### 1.4.1. Testículos

Los testículos son órganos glandulares con forma ovoidea, aplanados por los lados, de aproximadamente 5 cm de longitud, 3 cm de diámetro anteroposterior y 2,5 cm de ancho; su superficie es lisa y su consistencia firme. Su peso oscila entre 15 y 20 gramos. El parénquima testicular está rodeado por una túnica fibrosa muy resistente denominada túnica albugínea (Fig. 7a y 7b). Está suspendido por su región posterior y superior del cordón espermático y está fijado por su polo inferior a las cubiertas escrotales mediante una condensación de tejido fibroso denominada "*gubernaculum testis*". Los testículos están separados por un tabique medio y alojados en el interior de la bolsa escrotal, donde se diferencian siete capas que los revisten. Estas capas son: piel, dartos, túnica celular subcutánea, fascia espermática externa, cremáster, fascia espermática interna, túnica vaginal parietal y túnica vaginal visceral.

La vascularización procede de las arterias espermática, deferencial y funicular y su drenaje venoso se realiza por medio de una red anastomótica pampiniforme que confluye formando la vena espermática.

Estructuralmente, los testículos están formados por un parénquima rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso llamada túnica vaginal, la cual penetra en el parénquima y lo divide en lóbulos (Fig. 7a y 7b). En el interior de los lóbulos se encuentran los túbulos seminíferos (Fig.7c). Los túbulos seminíferos muestran un

## INTRODUCCIÓN

patrón irregular de circunvoluciones pero sus dos extremos forman un solo conducto que termina en una serie de canales o rete testis (Fig.7c). Estos túbulos están formados por un epitelio poliestratificado con una luz central. En el epitelio se encuentran dos tipos celulares, las células germinales en distinto estadio de maduración y las células de Sertoli. Las células de Sertoli son de gran tamaño y están adosadas a la capa más interna de la membrana basal, desde donde se extienden radialmente hasta la luz del túbulo (Fig. 7d). Su citoplasma forma prolongaciones que rodean las células germinales. Entre las células de Sertoli existen unas uniones estrechas, formando la barrera hematotesticular. Esta barrera divide el epitelio germinal en un compartimento basal y otro luminal de forma que aísla a las células germinales y evita la difusión de autoantígenos del interior del túbulo a los vasos sanguíneos. En el tejido intersticial se encuentran células de Leydig, fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos y pequeños nervios no mielinizados (Fig.7e).

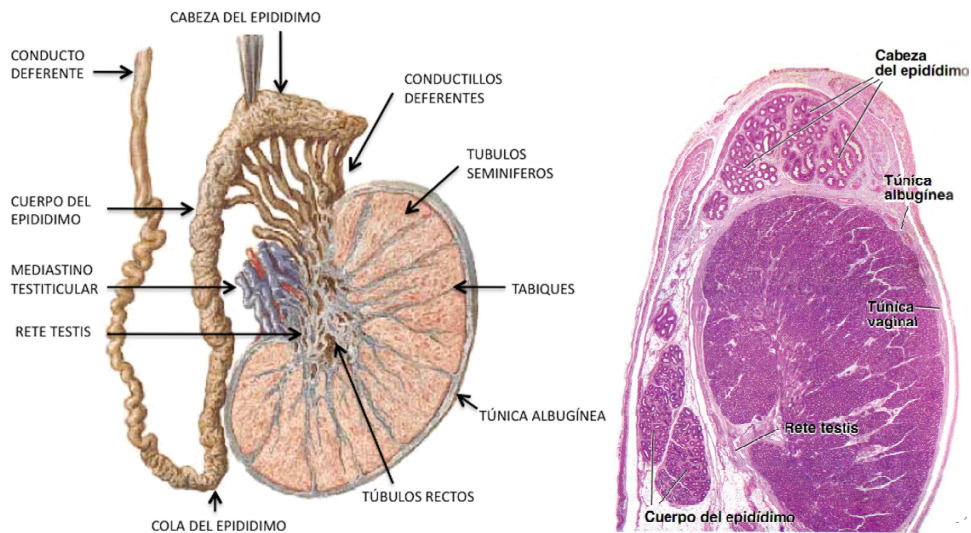


Figura 7a y 7b. Anatomía del testículo y sección histológica del testículo.

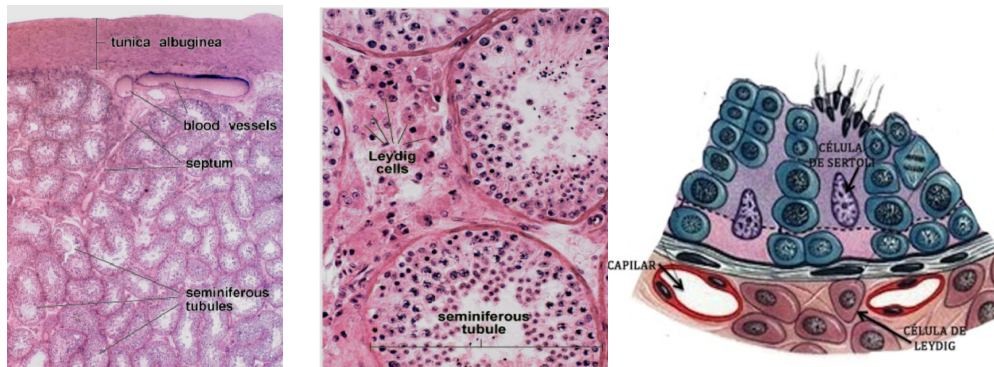


Figura 7c y d. Representación microscópica del lobulillo testicular a la izquierda y de un túbulo seminífero en tinción hematoxilina-eosina. Figura 7e. Sección de un túbulo representando las células de Leydig y Sertoli.

#### 1.4.2. Vías espermáticas: Epidídimo

Es la primera porción del conducto espermático. El epidídimo es una estructura tubular muy enrollada, constituido por la reunión y apelotonamiento de los conductos seminíferos con forma de media luna y situado en el borde superior y posterior de cada testículo. Poseen una capa de tejido muscular liso y un epitelio con células secretoras hacia el lumen. Tienen una longitud aproximada de 5 cm y se distingue una cabeza, un cuerpo y una cola.

Los epidídimos tienen por función albergar a los espermatozoides procedentes de los túbulos seminíferos testiculares hasta la maduración. En su interior, los espermatozoides pueden almacenarse durante más de 40 días y mantener su fertilidad, para luego ser desplazados al exterior o ser reabsorbidos. La cola del epidídimo se continúa con el conducto deferente, lugar donde los espermatozoides inician el ascenso.

#### 1.4.3. Vías espermáticas: Conducto deferente

Son dos conductos de aproximadamente 30-40 cm de longitud que nacen a continuación de la cola de cada epidídimo. Su función es trasladar los espermatozoides maduros hacia los conductos eyaculadores. Junto con los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, los conductos deferentes conforman el cordón espermático. De afuera hacia dentro se componen de tejido conectivo laxo, de una capa muscular lisa y de una mucosa en contacto con el lumen.

## INTRODUCCIÓN

Los conductos deferentes derecho e izquierdo ascienden desde el escroto transportando los espermatozoides maduros eliminados por el epidídimo, atraviesan el canal inguinal e ingresan en la cavidad pelviana. En su trayecto final, al acercarse a la glándula prostática, ambos conductos deferentes se aproximan y se dilatan formando la ampolla de Henle, que junto al conducto de cada glándula seminal dan origen a los conductos eyaculadores. Durante la eyaculación, los tubos lisos se contraen, enviando el semen a los conductos eyaculatorios y luego a la uretra, desde donde es expulsado al exterior.

### **1.4.4. Vías espermáticas: Conducto eyaculador**

Los conductos eyaculadores se originan a continuación de los conductos deferentes de cada lado y finalizan en la uretra prostática. Son pequeños tubos de 2 cm de longitud que pasan por el interior de la próstata, reciben las secreciones de las vesículas seminales y depositan todo el contenido en la uretra.

### **1.4.5. Uretra**

Es el último tramo del conducto espermático. Es un órgano impar que tiene una longitud de 18-20 centímetros. Se inicia en la vejiga urinaria y cumple doble función, conducir la orina durante la micción y el semen durante la eyaculación. La uretra masculina posee tres porciones llamadas prostática, membranosa y peneana.

*Uretra prostática:* recibe el semen de los conductos prostáticos y de los conductos deferentes. Tiene una longitud de 3 cm y atraviesa toda la glándula prostática.

*Uretra membranosa:* Mide entre 1 y 2 cm de largo. Presenta un esfínter uretral externo formado por musculatura esquelética que permite controlar el reflejo de la micción. Está ubicado en la base del pene, inmediatamente por debajo de la próstata.

*Uretra peneana:* Tiene una longitud de 15 cm de largo. Se proyecta por la cara inferior (ventral) del pene y termina en el meato urinario externo. La uretra peneana también se denomina uretra esponjosa

### **1.4.6. Vesículas seminales**

Las vesículas seminales son glándulas de forma lobulada productoras de aproximadamente el 70% del volumen del líquido seminal y están situadas detrás de

la vejiga urinaria, por arriba de la próstata y delante del recto. Los conductos de ambas estructuras se unen con la porción final de los conductos deferentes dando origen a los conductos eyaculadores.

Las vesículas poseen un epitelio secretor que produce un líquido viscoso rico en fructosa, monosacárido de alto valor nutritivo para los espermatozoides. Este fluido, además de nutrir, protege y estimula el desplazamiento de las células sexuales masculinas. Junto al líquido prostático, conforman el fluido seminal.

#### **1.4.7. Próstata**

La próstata es una estructura redondeada y firme, ubicada en la base de la vejiga urinaria y por delante del recto. Está formada por tejido muscular y glandular. El tejido glandular está constituido por túbulos que se comunican con la uretra a través de diminutos orificios. La uretra y los conductos eyaculatorios atraviesan la glándula prostática. Luego de un trayecto, estas vías urinaria y seminales convergen. A partir de ese punto, tanto la orina como el semen realizan el mismo recorrido por la uretra penénea hacia el exterior, aunque nunca en forma simultánea.

La función de la próstata es segregar en forma continua un líquido blanquecino denominado fluido prostático, sustancia que junto al líquido de las glándulas seminales y los espermatozoides forman el semen. La misión del líquido prostático es activar la movilidad de los espermatozoides y prevenir la aglutinación de los espermatozoides gracias a la presencia de la proteína denominada antigelatina. Además, debido a su pH alcalino, el fluido prostático protege la vitalidad de los espermatozoides al neutralizar la acidez de la uretra.

#### **1.4.8. Glándula bulbouretral**

Son pequeñas estructuras pares que se ubican a los lados de la uretra membranosa. También denominadas glándulas de Cowper (en honor al autor que las describió por primera vez) segregan un líquido mucoso que drena dentro de la uretra antes de la eyaculación (fluido pre-eyaculatorio) para limpiar y lubricar la uretra. El fluido de las glándulas bulbouretrales es alcalino como el líquido prostático.

### **1.4.9. Pene**

Es uno de los órganos externos del sistema reproductor masculino, junto con la bolsa escrotal. Tiene forma cilíndrica y se ubica en la parte anterior de la sínfisis púbica, por delante del escroto cuando está flácido. El interior del pene está compuesto por tejido eréctil, dispuesto en dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso, ocupando toda la longitud del órgano. Los cuerpos cavernosos se sitúan por encima de la uretra y son los que se llenan con mayor cantidad de sangre durante la excitación sexual. El cuerpo esponjoso, más pequeño que los anteriores, se halla en la parte inferior rodeando a la uretra, siendo su función evitar la compresión de la misma cuando el pene está erecto. Alrededor del 90% de la sangre se dispone en los cuerpos cavernosos, mientras que el 10% restante lo hace en el cuerpo esponjoso.

Los cuerpos cavernosos están cubiertos por la túnica albugínea, dura y resistente membrana que interviene en la erección. Esta envoltura está rodeada por otra capa superficial que se continúa con la pared abdominal.

El pene está revestido por piel muy elástica, que se continúa con la piel de la bolsa escrotal y del área pubiana. Se divide en tres partes: glande, cuerpo (parte libre del pene sin el glande) y raíz (la porción anclada en los huesos púbicos y diafragma urogenital)

### **1.4.10. Escroto**

Estructura externa del sistema reproductor masculino con forma de bolsa que sirve para alojar y proteger a los testículos, el epidídimo y el conducto deferente. El escroto tiene piel fina y rugosa. En su interior está dividido en dos zonas para albergar a cada testículo y a un tramo de los cordones espermáticos.

## 1.5. FISIOPATOLOGÍA

### 1.5.1. Testículos

La espermatogénesis es un término que resume la función exocrina testicular y comprende la formación, almacenamiento y posterior expulsión de los espermatozoides a partir de las espermatogonias. Para la espermatogénesis se necesitan dos grupos celulares: espermatogonias y células de Sertoli. La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos en donde se encuentran las células germinales en diversas fases de desarrollo (Fig. 8). Este proceso se inicia en la pubertad y continúa hasta la vejez.

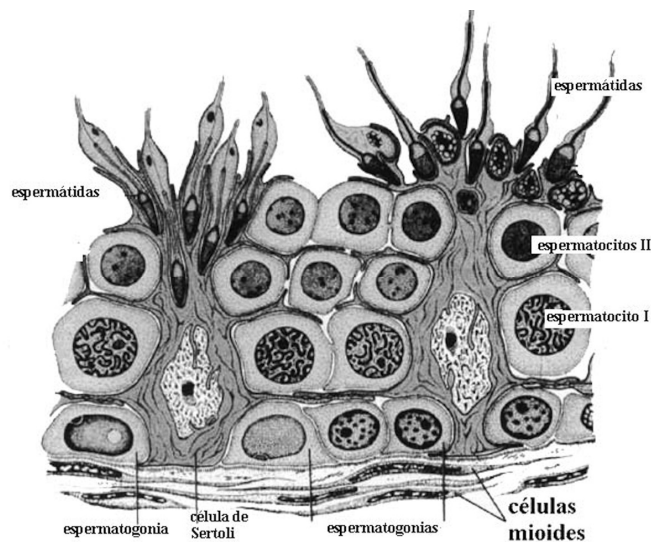


Figura 8. Ilustración del proceso de la espermatogénesis, proceso por el cual las células germinales localizadas en la lámina basal de los túbulos seminíferos sufren divisiones y diferenciaciones que culminan con la formación de espermatozoides maduros.

Podemos definir tres fases en la espermatogénesis (Fig. 9):

1ª Fase: Proliferación mitótica. En esta fase las células germinales o **espermatogonias** se dividen por mitosis con dos funciones: obtener **espermátocitos primarios** que tienen 46 cromosomas y mantener el número de espermatogonias. Durante la espermatogénesis, las espermatogonias que inician su diferenciación dan lugar a distintos tipos de espermatogonias en diferentes estadios de maduración y morfológicamente definibles llamadas A oscuras, A claras y B que finalmente se transforman en espermátocitos primarios.

2ª Fase: División meiótica. Se produce una transformación por meiosis de los **espermátocitos primarios** (número diploide de cromosomas) en dos **espermátocitos**



## INTRODUCCIÓN

**secundarios** (número haploide, uno con el cromosoma sexual X y otro con el Y). Los espermátocitos secundarios se dividen rápidamente por mitosis y se transforman en **espermátidas** que se encuentran localizadas cerca de la luz del túbulo como se representa en la figura 8.

3ª Fase: Diferenciación de la espermátida o espermiogénesis que consiste en la maduración de la espermátida hasta convertirse en espermatozoide. Comprende la formación de la cola, desarrollo de mitocondrias y desarrollo del acrosoma. Las espermátides se transforman en espermatozoides que contienen 23 cromosomas por el fenómeno de la espermiogénesis.

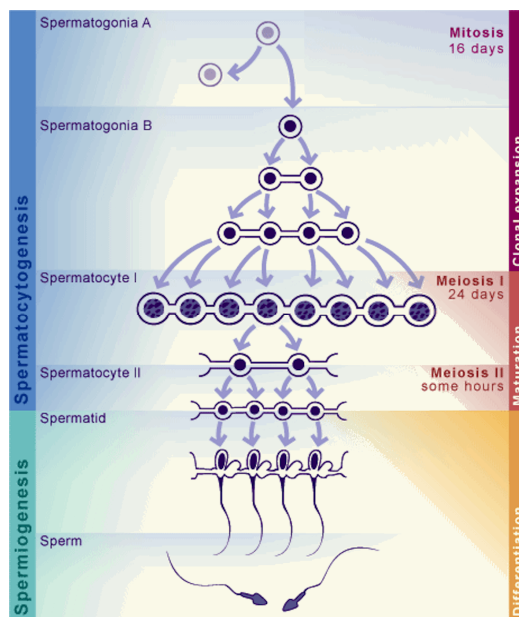


Figura 9. Fases de la espermatogénesis

En los seres humanos, la espermatogénesis es fisiológica a una temperatura 32 a 35°C por esta razón los testículos están alojados en el escroto, fuera de la cavidad abdominal. El ciclo de la espermatogénesis es constante, de alrededor de 64 días. Cada día aproximadamente alrededor de 300 millones de espermatozoides completan el proceso de espermatogénesis (26).

MITOSIS DE ESPERMATOGONIAS	16 DÍAS	HASTA LA FORMACIÓN DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS
PRIMERA MEIOSIS	24 DÍAS	DESDE LA DIVISIÓN DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS HASTA SECUNDARIOS
SEGUNDA MEIOSIS	POCAS HORAS	PARA GENERAR LAS ESPERMÁTIDES
ESPERMIOGENESIS	24 DÍAS	HASTA LA FORMACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
TOTAL	64 DÍAS	

Tabla 2. Duración del ciclo de la espermatogénesis

Dos hormonas son esenciales para la producción de espermatozoides, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la testosterona intratesticular. En la pared de los túbulos seminíferos se encuentran, además, las células de Sertoli que proporcionan un soporte mecánico y metabólico a los espermatozoides y en el tejido conjuntivo situado entre los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig (Fig.10) que son las encargadas de secretar la hormona testosterona (27).

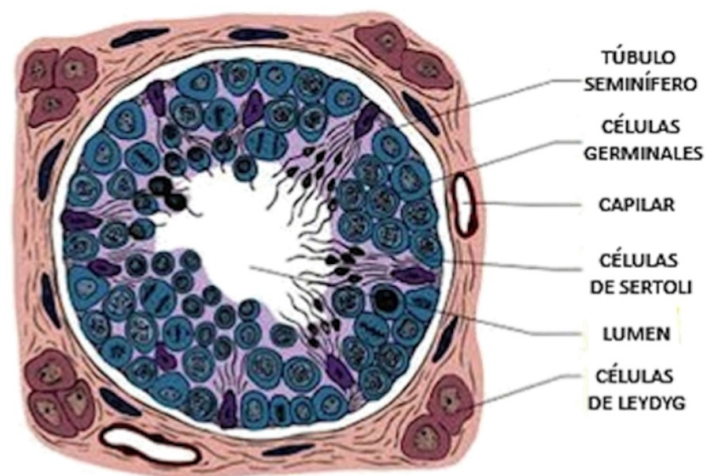


Figura 10. Células y soporte mecánico para el desarrollo de la espermatogénesis.

La **función endocrina** testicular se realiza mediante las hormonas que sintetizan esencialmente dos tipos de células: las células de Leydig y de Sertoli.

1. *Las células de Sertoli*: ocupan todo el espesor de la pared de los túbulos seminíferos y son esenciales en la espermatogénesis, cualquier alteración en estas células puede conducir a la infertilidad por una producción anormal de espermatozoides. La actividad de las células de Sertoli se encuentra regulada por la FSH y entre sus funciones están:

## INTRODUCCIÓN

- Nutrir y proteger a las células germinativas.
- Fagocitar espermatogonias en largos períodos de abstinencia sexual.
- Transformar la testosterona en dihidrotestosterona.
- Secretar estrógenos, enzimas y metabolitos implicados en la maduración de los espermatozoides.
- Secretar líquido.
- Secretar la proteína ABP (“*androgen binding protein*”) que asegura el transporte local de los andrógenos testiculares (testosterona)
- Producir la hormona Inhibina cuya función principal es asegurar la retroalimentación negativa sobre la FSH.
- Producir la Hormona Antimülleriana (AMH), responsable de la regresión de los conductos de Müller en los niños.
- Producir la Activina que estimulará la producción FSH hipofisaria gracias a una retroalimentación positiva.

2. Las células de Leydig sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas que se conocen globalmente como andrógenos bajo el control de la hormona luteinizante (LH). Sin embargo, en estas células también se sintetizan pequeñas cantidades de estrógenos. Los andrógenos más importantes producidos por el testículo son la testosterona, dihidrotestosterona y androstenodiona.

Las funciones de la testosterona son:

- Intervenir en el desarrollo embrionario del aparato genital externo masculino.
- Mantener la espermatogénesis, actuando sobre receptores situados en las células de Sertoli. La testosterona es incapaz de iniciar la espermatogénesis por sí sola, pero controla la velocidad y el mantenimiento de la misma actuando sobre las células de Sertoli, únicamente cuando sobre éstas ya ha tenido lugar la acción de FSH de la adenohipófisis.
- Es responsable de diversas características del sexo masculino, como algunos aspectos del comportamiento, mayor masa muscular, modificaciones de la laringe, del desarrollo de las glándulas sexuales accesorias del tracto reproductor masculino y de contribuir a la libido o impulso sexual. A su vez la producción de testosterona está controlada por la LH, la cual se une a

receptores de membrana específicos de esta célula activando al adenosín monofosfato cíclico (AMPC).

### 1.5.2. Regulación hipotálamo-hipofisaria

La producción hipofisaria de FSH y LH (gonadotropinas) se produce en la adenohipófisis bajo la acción de la GnRH (hormona Liberadora de Gonadotropinas) secretada por el núcleo preóptico y arcuato del hipotálamo. La inhibina producida por las células de Sertoli proporciona una retroalimentación negativa sobre la producción hipofisaria de FSH. Por lo tanto, la evaluación de la función sertoliana se puede hacer mediante la medición de FSH. La testosterona y estradiol, producido por las células de Leydig, proporcionan la retroalimentación negativa sobre la LH de la pituitaria (Fig.11).

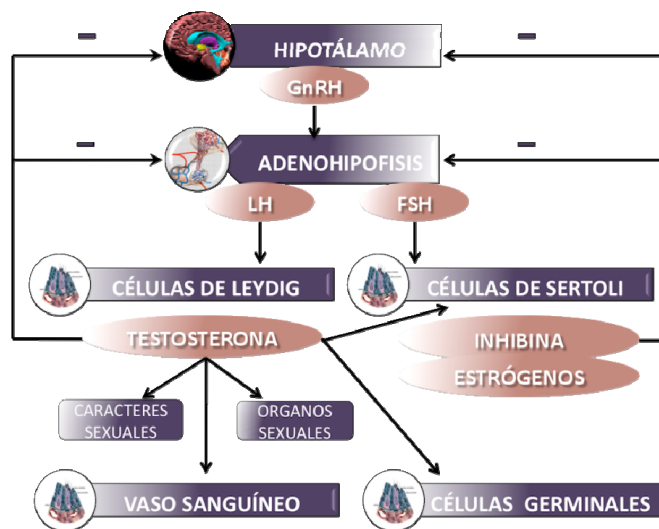


Figura 11. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y esquema de la función endocrina testicular.

### 1.5.3. Papel del cromosoma Y

El cromosoma Y juega un papel importante en la función reproductiva masculina. En primer lugar, es esencial para la determinación del sexo masculino a través de su Gen SRY (*Sex-determining Region Y*) (28). Éste proporciona otros muchos genes implicados en la espermatogénesis. De hecho, la región AZF (factor de azoospermia) localizada en el brazo largo del cromosoma Y (Yq11) y descubierta por Tiepolo y Zuffardi, contiene muchos genes involucrados en la infertilidad masculina dado que son responsables de codificar proteínas implicadas en la regulación de la

## INTRODUCCIÓN

espermatogénesis (29,30). Las microdeleciones en Yq representan aproximadamente un 7.6% de las causas de origen genético de la infertilidad masculina (31,32).

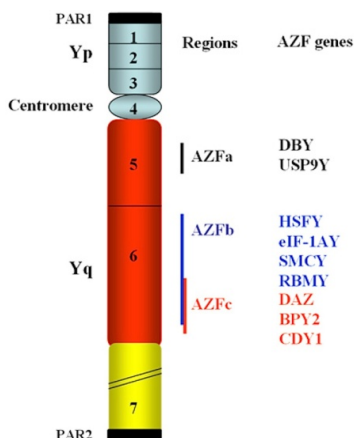


Figura 12. Esquema del cromosoma Y y de las regiones AZFa, AZFb, AZFc.

### 1.5.4. Papel del epidídimo, próstata y vesículas seminales

El epidídimo es un órgano dependiente de andrógenos que concentra el esperma y permite a los espermatozoides adquirir su movilidad y su capacidad fecundante. La carnitina libre, la alfa 1-4 glucosidasa, y la glicerofosforilcolina son marcadores bioquímicos específicos del epidídimo (33,34).

La próstata y las vesículas seminales son glándulas involucradas en el desarrollo de los espermatozoides a través de sus secreciones. La próstata es responsable de la secreción ácida rica en ácido cítrico, zinc y magnesio. Mientras que las secreciones de las vesículas seminales son básicas, ricas en fructosa y prostaglandinas.

## 1.6. CAUSAS DE INFERTILIDAD

Las causas de infertilidad se pueden clasificar en pretesticulares, testiculares y post-testiculares.

### 1.6.1 Causas pretesticulares:

**1.6.1.1. Endocrinopatías:** Las anomalías en cualquier parte del eje hipotálamo-hipofisario gonadal (HHG) tienen un impacto negativo sobre la fertilidad en el varón.

Los problemas endocrinos que causan infertilidad masculina pueden ser evaluados inicialmente por los niveles de testosterona, LH, FSH, prolactina y estradiol (35).

**1.6.1.1.1. Insuficiencia del eje hipotálamo-hipofisario.** La producción insuficiente de GnRH y/o la falta de producción de FSH y LH de la hipófisis provocan un hipogonadismo hipogonadotrópico (testosterona, FSH, LH disminuidos) con una alteración de la espermatogénesis (azoospermia secretora). El crecimiento adenomatoso de la hipófisis es otra rara causa de infertilidad masculina. Las masas hipofisarias pueden interferir con la liberación de gonadotropinas por compresión directa del sistema portal y/o por secreción disminuida de FSH-LH que causa hipogonadismo hipogonadotrópico. Por ello, en pacientes con niveles de testosterona y LH disminuidos, hay que considerar la realización de una RM cerebral con el fin de excluir esta posibilidad diagnóstica. La hiperprolactinemia también puede ser vista en asociación con los adenomas hipofisarios. Los niveles de prolactina elevados interfieren con la liberación normal pulsátil de GnRH y pueden ser una causa de hipogonadismo con subsecuente disfunción e infertilidad sexual.

**1.6.1.1.2. Bloqueo del eje hipotálamo-hipofisario.** Este eje es especialmente sensible al efecto inhibitorio de fármacos (antihipertensivos, psicotrópicos, hormonas, etc.), estrógenos (de origen tumoral, hipertiroidismo, obesidad o alcoholismo crónico), andrógenos (inducidos por un tumor, hiperplasia congénita suprarrenal, hipotiroidismo) y de la prolactina (prolactinoma o hipotiroidismo) (36). La administración de andrógenos exógenos causa una supresión de la producción endógena de testosterona. El empleo de esteroides anabolizantes causa una retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y de la glándula pituitaria, provocando la disminución de la liberación de LH. La espermatogénesis normal requiere de unos niveles intratesticulares de testosterona adecuados, en pacientes que usan esteroides, la producción de esperma está considerablemente reducida encontrándose a menudo azoospermia. El grado y la reversibilidad de los efectos perjudiciales de los esteroides sobre la espermatogénesis depende de la dosis, la duración y el empleo de los esteroides exógenos (37).

**1.6.1.2. Endocrinopatías genéticas:** Las anomalías genéticas (Tabla 3) pueden causar un malfuncionamiento del eje HHG en cualquier punto del mismo afectando

## INTRODUCCIÓN

bien a la hormona, al factor de crecimiento y/o al receptor. Son trastornos poco comunes, causados por mutaciones, deleciones pequeñas, o expansiones polimórficas dentro de genes específicos implicados en la regulación endocrina del desarrollo y de la función sexual. Por lo general, son trastornos que afectan severamente a la fertilidad masculina (38-45).

TRASTORNO	CAUSA	TRATAMIENTO
<b>Trastornos en la secreción de GNRH</b>		
• Síndrome de Kallman	Mutación en el gen KAL (Xp 22.3)	Terapia sustitutiva de FSH y HCG
• Ausencia de receptores GnRh	Defectos en el acoplamiento de la proteína G a GnRH	Terapia sustitutiva de FSH y HCG
• ↓Secreción de GnRH	Mutación en el gen 1-convertasa	Terapia sustitutiva de FSH y HCG
• Síndrome de Prader Willi	Mutación en 15q11q13	Terapia sustitutiva de FSH y HCG
<b>Trastornos en la función de LH y FSH</b>	Defectos en la estructura de LH o FSH o en sus receptores	Terapia sustitutiva de FSH y HCG si LH o FSH presentan defectos estructurales
<b>Trastornos en la función androgénica</b>		
• Hiperplasia congénita adrenal	Mutaciones en las enzimas esteroideas	Terapia con corticoides, mineralocorticoides y andrógenos
• Insensibilidad androgénica	Mutación en genes receptores de andrógenos	Candidatos a extracción testicular de esperma /FIV/ ICSI
• Déficit de 5 $\alpha$ -reductasa.	Mutaciones en el gen 5 $\alpha$ -reductasa	

Tabla 3. Endocrinopatías genéticas que causan infertilidad masculina.

### 1.6.2. Causas testiculares:

**1.6.2.1. Causas Genéticas:** Un desorden genético puede alterar la espermatogénesis, poner en peligro el desarrollo normal del aparato genital, disminuir la motilidad del esperma y su capacidad de fertilización. Cualquiera de estos factores pueden conducir a diferentes grados de subfertilidad o infertilidad masculina. Los trastornos genéticos pueden ser caracterizados como alteraciones del cariotipo, deleciones específicas de los cromosomas implicados en la regulación de la espermatogénesis, o mutaciones específicas en los genes. Las anomalías en el cariotipo son más frecuentes en los varones infértiles (5,8%) que en una población normal de varones recién nacidos (0,5%) (46). Las anomalías en el cromosoma sexual son más comunes (el 4,2%) que en el cromosoma autosómico. Los defectos de los cromosomas son subclasificados como numéricos o estructurales. Las anomalías numéricas incluyen deleciones o duplicación de cromosomas enteros. Las anomalías estructurales incluyen la deleción, la inversión, o la duplicación de una parte de un cromosoma o desplazamiento de parte de un cromosoma al otro cromosoma.

Tanto las anomalías estructurales cromosómicas como las numéricas son observadas en pacientes con azoospermia y oligozoospermia severa pudiendo estar afectado bien el cromosoma autosómico, los cromosomas sexuales, o ambos. Entre el 6 y 13% de los hombres infértiles tienen anomalías cromosómicas en su cariotipo (37). Entre estas anomalías se incluyen las representadas en la Tabla 4.

SÍNDROMES	ANOMALÍA DEL CARIOTIPO	FENOTIPO
Síndrome de Klinefelter	46,XY/47,XXY mosaico, 47,XXY-49,XXX	Talla alta, testes pequeños y duros, ginecomastia
Disgenesia gonadal mixta	45,X/46,XY mosaico	Varón , Mujer, o genitales ambiguos, testes y gonada en cordón
Síndrome del hombre XX o síndrome de la Chapelle	46,XX con translocación del gen SRY al brazo corto de uno de los cromosomas X	Varón con sólo células de Sertoli en la biopsia testicular
Síndrome del doble Y (superhombre)	47,YY	Normal, altos

Tabla 4. Anomalías cromosómicas que causan infertilidad masculina

El *Síndrome de Klinefelter* (47, XXY): es la anomalía cromosómica más frecuente, y puede ser pura o en mosaico. Tiene una incidencia de 1/ 1.000 nacidos vivos y 1/300 fetos de abortos espontáneos. La frecuencia en los hombres infértiles es de 1 a 2%, pero en la población azospermica es de 7 a 13% (47,48). El fenotipo prepuberal es normal, pero después de la pubertad las características más notorias son atrofia testicular bilateral con consistencia firme, deterioro de las características sexuales secundarias, algunas veces un cierto nivel de dislexia e incluso retardo mental. El 50% de los casos muestran ginecomastia, altas concentraciones de FSH y LH y bajas dosis de testosterona. Obviamente, casi todos estos pacientes son infértiles, con oligozoospermia o azoospermia severas. Los testículos por lo regular presentan hialinosis y esclerosis tubular, pero hay algunos casos de túbulos con espermatozoides; se han descrito embarazos por fertilización asistida (49). Hay variantes del síndrome tales como 48,XXX, 48,XXYY y 49,XXX, y se acepta generalmente que cuantos más cromosomas X presente el paciente, peor es la lesión testicular.



**1.6.2.2. Causas no genéticas** La insuficiencia testicular no cromosómica puede ser idiopática o adquirida. Entre sus causas podemos citar las siguientes enfermedades:

**1.6.2.2.1. Varicocele.** El varicocele es una entidad común que se produce por la dilatación de las venas del cordón espermático y se encuentra en el 15% de la población general masculina (50), pero esta incidencia aumenta aproximadamente a un 40% (51) entre los hombres con infertilidad primaria y entre un 45% y 81% de los hombres con infertilidad secundaria (52), por lo que la mayoría de los varicoceles han sido identificados como una causa corregible de infertilidad masculina. De acuerdo con la OMS (1992a), entre los hombres que consultaron al médico por problemas de fertilidad, se identificó varicocele en el 11% de aquellos que tenían semen normal y en el 25% con semen anormal. La mayor dificultad reside en determinar si el varicocele realmente afecta la función testicular y por ende al semen. Por otra parte, surge el interrogante de si su cura realmente mejora la fertilidad y si ese es el caso, en qué grupos de pacientes lo hace. Aparentemente el varicocele afecta la espermatogénesis y muestra una relación clara con el semen anormal (OMS, 1992a); sin embargo, los mecanismos no han sido todavía establecidos existiendo varias teorías sobre la fisiopatología de los varicoceles como causantes de la infertilidad masculina. Una teoría es que el pobre drenaje venoso interrumpe el intercambio de calor en el cordón espermático provocando un aumento de la temperatura escrotal que alterará la espermatogénesis (53,54). Otra teoría es que los metabolitos celulares como consecuencia del pobre drenaje venoso actúan como gonadotoxinas (55). También existe una teoría hormonal sobre la alteración de la espermatogénesis dado que se han encontrado niveles de testosterona anormales en los hombres con varicocele mejorando después de la reparación del mismo (56). Cualquiera que sea la fisiopatología del varicocele, hay suficiente evidencia para demostrar que produce daño testicular progresivo. Sin embargo, hay una importante discusión sobre si el tratamiento realmente mejora la fertilidad, con evidencias a favor y en contra. En una revisión *Pryor y Howard* (50) confirman que la reparación del varicocele mejora la calidad del semen en el 51% a 78% de los pacientes, y el 24% a 53% de los pacientes iniciaron embarazos espontáneos. También se ha confirmado en el estudio de *Cayan et al.* (57) que la reparación del varicocele ofrece a las parejas subfértiles no sólo una mejora de la tasa espontánea del embarazo, sino también de la calidad del semen, lo que puede permitir un cambio en la elección de la tecnología de

reproducción asistida necesaria para lograr el embarazo. En resumen, aunque muchos varicoceles no están asociados a la infertilidad en el varón y no todos los varicoceles necesitan corrección quirúrgica o embolización percutánea, la presencia de un varicocele detectable en el niño o en el adulto asociado a un seminograma patológico, es una indicación justificada para el tratamiento.

**1.6.2.2.2. La criptorquidia** es la ausencia de uno o de los dos testículos dentro de las bolsas escrotales, los cuales se encuentran generalmente en la cavidad abdominal. Su incidencia a partir del primer año de edad es del 0,8% (58). Muchos de estos hombres son subfértiles aunque la fisiopatología exacta por lo que se produce la infertilidad no se ha definido evocándose diferentes teorías, una de ellas es que la localización anatómica de los testículos fuera de la bolsa escrotal causa una alteración de la espermatogénesis. Los testículos criptorquídicos revelan pequeños túbulos seminíferos, disminución del número de espermatogonias, y un engrosamiento de las membranas basales. La incidencia de azoospermia en la criptorquidia unilateral es de un 13% y esta cifra aumenta hasta el 89% en la criptorquidia bilateral no tratada, por lo que la criptorquidia es el factor etiológico más común de azoospermia en el adulto (59). Recientes estudios han sugerido que la orquidopexia debe realizarse antes del primer año de edad con el fin de reducir al mínimo la pérdida de células germinales, dado que el índice de fertilidad (número de espermatogonias por tubo) se ve afectado negativamente en los niños con criptorquidia y mayores de un año (60).

**1.6.2.2.3 Exposición a gonadotóxicos:** Numerosas sustancias y profesiones han sido implicadas en la disminución de la calidad del semen. Algunas se representan en la tabla 5. Los efectos de los agentes son reversibles si el gonadotóxico es retirado o su actividad cesa antes de que el semen sea azoospermico. La radiación y la quimioterapia pueden dañar permanentemente el epitelio germinal causando una recuperación variable de la espermatogénesis. Por ello, se recomienda que los pacientes depositen su semen antes de iniciar la terapia con el fin de conservar su fertilidad. Después de la quimioterapia, se recomienda a los pacientes no concebir durante 2 años, durante este tiempo se llevan a cabo seminogramas para evaluar si el paciente es incapaz de concebir de una manera correcta. A pesar de la azoospermia existente después de la quimioterapia, el 41% de los hombres presentan espermatozoides en el testículo que pueden ser usados con técnicas como FIV-ICSI (61).

GONADOTÓXICOS	
FÁRMACOS	Cimetidina Sulfasalazina Nitrofurantoina Anabolizantes Narcóticos Quimioterápicos
TÉRMICOS	Soldadores Trabajadores de cerámica
RADIACIÓN	Radioterapia Trabajadores en plantas nucleares
DROGAS	Marihuana Tabaco Alcohol
METALES PESADOS	Fabricación de baterías Impresión
QUÍMICOS	Disolventes orgánicos Pesticidas

Tabla 5. Factores con influencia negativa sobre la espermatogénesis

### 1.6.3. Causas post-testiculares

Estas representan todos los problemas que impiden la llegada de espermatozoides al tracto genital masculino o femenino.

**1.6.3.1. Obstrucción de las vías seminales.** La obstrucción del sistema excretor ductal puede ocurrir a lo largo de los conductos eyaculatorios, los conductos deferentes, y/o el epidídimo. La historia clínica, el examen físico, los parámetros del semen, y los estudios radiológicos se pueden utilizar para identificar el nivel de la obstrucción. Entre las causas más comunes tenemos:

- *La agenesia bilateral congénita de las vesículas seminales:* es una forma genital de la mucoviscidosis (62) que se debe a la mutación del gen CFTR de la fibrosis quística. También existen las agenesias de los conducto deferentes unilaterales o agenesia de los conductos eyaculadores (62,63).
- *Obstrucción adquirida:* de etiología infecciosa (infecciones de transmisión sexual, tuberculosis genital...), traumática, tumoral (obstrucciones de los conductos eyaculadores) o iatrogénica (cirugía de la hernia, varicocele, hidrocele).

**1.6.3.2. Disfunción eréctil y/o eyaculatoria:** impide la deposición de los espermatozoides dentro de la vagina. La eyaculación consiste en la deposición coordinada de semen en la uretra prostática (emisión), el cierre del cuello de la vejiga, y la contracción del músculo periuretral y del suelo de la pelvis causando la expulsión del semen a través de la uretra (eyaculación). El proceso de la eyaculación está controlado tanto por el sistema nervioso central como el periférico. La emisión es controlada por las neuronas simpáticas procedentes de T10-L3 que viajan a través de los ganglios simpáticos paravertebrales. La eyaculación requiere la inervación motora somática de S2-4 y continúa a través de los nervios pudendos a la vejiga, el cuello y a la musculatura del suelo pélvico.

Las alteraciones en la eyaculación pueden conducir a una falta de emisión de la eyaculación y/o a una eyaculación retrógrada como consecuencia de un cierre incompleto del cuello de la vejiga. Está causado tanto por trastornos neurológicos como anatómicos y condiciones psicológicas representadas en la tabla 6. El tratamiento de estos trastornos puede ser médico o quirúrgico.

Las causas neurológicas de fracaso de la emisión y de eyaculación retrógrada pueden ser tratadas con agentes simpaticomiméticos que aumentan las emisiones y cierran el cuello vesical.

DIABETES	Neuropatía periférica
CIRUGÍAS PREVIAS	Extirpación de la cadena simpática
LESIONES DEL SNC	Médula espinal Mielodisplasia
MEDICAMENTOS	Antidepresivos Antipsicóticos Antihipertensivos
ANATÓMICAS	Obstrucción de los conductos eyaculadores

Tabla 6. Diferentes causas que condicionan trastornos de la eyaculación.

**1.6.3.3. Infertilidad inmunológica:** El nueve por ciento de un 33% de las parejas infértiles presentan anticuerpos antiespermatozoides. Entre el 8% a 19% de estas parejas los anticuerpos están presentes en el hombre y entre el 1% al 21% los anticuerpos son aportados por la mujer (64,65). Los factores de riesgo para la formación de anticuerpos antiespermatozoides en los hombres son la vasectomía y la epididimitis, aunque la causa exacta para la formación de anticuerpos no es conocida.

## INTRODUCCIÓN

Estos anticuerpos antiespermatozoides causan la aglutinación de los espermatozoides y pueden disminuir la fertilidad en varios puntos críticos de la concepción natural, bien dificultando la motilidad espermática, la penetración de los espermatozoides a través del moco cervical y/o la reacción del acrosoma con la zona pelúcida (66-68).

### 1.7. ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

Se recogen las principales características a tener en cuenta para realizar un diagnóstico de infertilidad e identificar su etiología.

#### 1.7.1. Historia clínica

Se trata de un paso fundamental en el diagnóstico dado que puede aportar mucha información si se lleva a cabo minuciosamente, permitiéndonos conocer:

- La profesión y la exposición ocupacional a diferentes tóxicos: calor, radiación, productos químicos...
- Hábitos: tabaquismo, alcoholismo crónico, drogas ...
- Naturaleza de la infertilidad: primaria o secundaria si existe paternidad anterior.
- Duración de la infertilidad y resultados de otras exploraciones o posibles tratamientos llevados a cabo.
- Edad de la pareja.
- La calidad y la regularidad de la sexualidad de la pareja.
- Presencia de problemas de erección y / o eyaculación.
- Antecedentes quirúrgicos: ectopia, hernia testicular, varicocele, trauma...
- Antecedentes médicos: orquitis, orquiepididimitis, uretritis, radioterapia, quimioterapia, infecciones otorrinolaringológicas (ORL)
- Antecedentes familiares de infertilidad por si existen causa genéticas.

#### 1.7.2. Examen físico

En la inspección, se buscan signos de deficiencia de andrógenos y disfunción endocrina (distribución ginoide de la grasa, escasez de vello púbico y/o torácico, ginecomastia), así como presencia de cicatrices quirúrgicas abdominales e inguinales.

El examen físico debe ser general pero debe prestarse especial atención a los órganos genitales:

- Examen del pene: búsqueda de hipospadias posteriores que provocan una eyaculación ineficaz.
- Palpación de los testículos y valoración de su tamaño: el volumen testicular está relacionado con la espermatogénesis testicular (69). Este volumen se puede medir con un orquímetro considerando el testículo hipotrófico si su volumen comprende entre 6 y 15 ml y atrófico por debajo de 6 ml. La atrofia testicular permite establecer un diagnóstico de azospermia secretora (ausencia de producción de espermatozoides). Durante esta exploración se descubren a veces tumores o ectopias testiculares.
- La presencia y la palpación de los canales deferentes en busca de signos obstructivos de las vías seminales. De hecho, la ausencia de conductos deferentes orienta hacia una azospermia excretora tipo CBAVD (ausencia congénita bilateral de conductos deferentes), mientras que la presencia de nódulos de consistencia dura de los conductos deferentes sugiere una causa infecciosa (tuberculosis genitales....).
- Búsqueda de varicocele, hidrocele.
- El tacto rectal debe realizarse sistemáticamente para la valoración de la próstata y vesículas seminales.

### **1.7.3. Estudios complementarios básicos** (aquellas realizadas de manera rutinaria)

#### **1.7.3.1. Espermiograma**

El espermiograma es la primera etapa y un elemento esencial en la evaluación de la fertilidad masculina. Para una primera valoración de la fertilidad de un paciente deben realizarse dos espermiogramas con tres meses de intervalo. El espermatozoides no es una constante biológica, el trastorno puede ser sólo pasajero y es imposible sacar conclusiones de un solo espermiograma, incluso cuando el paciente presente azoospermia. Existen numerosas alteraciones observadas en un espermiograma que jamás se confirman en otros posteriormente realizados. La muestra debe obtenerse después de un período de abstinencia sexual de 3 a 5 días, porque ciertas características del espermatozoides varían en función del tiempo de abstinencia (volumen

## INTRODUCCIÓN

eyaculado, concentración espermática....etc.). Después de un lavado esmerado de las manos y del glande, el esperma se recoge en el laboratorio, por masturbación, en un recipiente estéril y de un solo uso. El recipiente se pone inmediatamente en una estufa de cultivo a 37 °C durante 20-30 minutos, tiempo necesario para la licuefacción. El examen del esperma tiene que hacerse inmediatamente después de la licuefacción o en la hora que sigue a su obtención. Los valores de referencia han sido definidos por la OMS en el año 1987, utilizando actualmente su quinta edición como estándar en los laboratorios de todo el mundo (Tabla 7) (70,71).

ESPERMIOGRAMA		2010 WHO parámetros	Percentil (95% CI)
VOLUMEN	2-6 ML	VOLUMEN	1.5 M (1.4-1.7)
PH	>7.2	NÚMERO	39 millones (33-46)
CONCENTRACIÓN	20 millones /ML	CONCENTRACIÓN	15 millones /ML (12-16)
MOVILIDAD	El esperma debe contener al menos un 50% de espermatozoides de movilidad progresiva (a+b) o más de un 25% de movilidad normal (a) (a) Movilidad normal, rápida y progresiva (b) Movilidad disminuida, lenta o débilmente progresiva (c) Movimientos in situ no progresivos (g) Espermatozoides inmóviles.	MOVILIDAD	32% (31-34)
VITALIDAD	>75% en la PRIMERA HORA	TOTAL (progresiva +no progresiva)	40% (38-42)
MORFOLOGÍA	>30% de ESPERMATOZOIDEOS NORMALES	VITALIDAD	58% vivos (55-63)
		MORFOLOGÍA	>4% (3-4)

Tabla 7. Valores de referencia de la OMS para la caracterización del semen humano.

En la interpretación del espermiograma se evalúan dos componentes; las características del plasma seminal y de los espermatozoides.

### 1.7.3.1.1. Características del plasma seminal:

- **Aspecto:** Un eyaculado normal tiene un aspecto opalescente. Un color pardo del eyaculado debe hacer pensar en una hemospermia.

- **Volumen:** Proporciona información sobre el funcionamiento del sistema glandular. El volumen medio eyaculado está entre 2 y 6 ml. Un volumen inferior a 2 ml (hipospermia) debe hacer pensar en primer lugar en una pérdida parcial de esperma en el momento de su recogida o en una eyaculación incompleta. La ausencia de estas dos causas frecuentes, fácilmente descartables por el interrogatorio al paciente, tiene que llevar a la búsqueda de hipogonadismo, niveles de testosterona plasmáticos bajos o agenesia vesicular. Además, la prostatitis y/o vesiculitis pueden reducir el volumen

seminal. La ausencia de esperma eyaculado (aspermia) sugiere, en primer lugar, una eyaculación retrógrada total, que se confirmaría por la búsqueda de espermatozoides y la dosificación de la fructosa en la orina. La fructosa, marcador bioquímico de las vesículas seminales, está normalmente ausente en la orina. Un gran volumen (hiperespermia) > 6 ml puede reflejar una infección.

- **PH:** La eyaculación es una mezcla de secreciones prostáticas ácidas y secreciones vesiculares básicas. El pH normalmente está comprendido entre 7,2 y 8,0. Un pH ácido < 7,2 refleja un fracaso o falta de secreción vesicular (por ejemplo, la agenesia de las vesículas seminales). Un pH básico > 7,8 sugiere un fracaso en la secreción prostática (prostatitis crónica).

- **Viscosidad:** Después de la licuefacción, ésta se evalúa mediante una aspiración suave en una pipeta y observando el modo en que el esperma gotea por efecto de la gravedad. La viscosidad es normal si el esperma cae gota a gota y está aumentada cuando el esperma no gotea o lo hace de forma filamentosa. Una viscosidad aumentada dificulta la medida de las diferentes características espermáticas como la movilidad o la concentración de los espermatozoides.

#### **1.7.3.1.2. Características de los espermatozoides**

- **Movilidad:** Se habla de astenoespermia o astenozoospermia si existe una reducción de motilidad de los espermatozoides en comparación con los valores normales. En ese caso se debe buscar una infección, presencia de anticuerpos anti-espermatozoides y/o un varicocele. Este estudio es a la vez cuantitativo (estimación del porcentaje de espermatozoides móviles) y cualitativo (tipo de movimiento de los espermatozoides). Es importante hacer esta apreciación a 37°C, lo cual es posible gracias a la platina calefactora del microscopio. Una temperatura diferente de 37°C modifica el movimiento espermático. Según su tipo de movimiento los espermatozoides se clasifican en 4 categorías: (clasificación de la OMS): rápidos y progresivos (a), lentos y progresivos (b), móviles en el sitio (c) o inmóviles (d). Estas categorías se expresan en porcentaje. La movilidad es considerada como normal si el porcentaje de espermatozoides progresivos, tipo a + tipo b, con al menos la mitad de tipo a es



## INTRODUCCIÓN

superior a 40. Una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles o astenospermia puede sugerir una infección del esperma, tanto más cuanto disminuye la movilidad a las 4 horas. También puede indicar una disquinesia flagelar.

Otras alteraciones del movimiento de los espermatozoides pueden haberse observado previamente en el simple examen en fresco entre porta- y cubreobjetos, por ejemplo los espermatozoides con trayectoria rectilínea por ausencia del movimiento lateral de la cabeza o espermatozoides hipermóviles, evocadores de una infección por micoplasmas. En la lectura de la movilidad de los espermatozoides es importante observar si existe aglutinación de espermatozoides. Son agrupaciones de algunos espermatozoides, paradójicamente hipermóviles, unidos ya sea por la cabeza, por la pieza intermedia, el flagelo o de modo mixto. Cuando los aglutinados de espermatozoides son numerosos, hay que confirmar el origen inmunológico investigando la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal o en los espermatozoides

- **Vitalidad:** hablamos de necroespermia o disminución de la vitalidad si la tasa de espermatozoides muertos es elevada (espermatozoides vivos <60%). Una disminución de la vitalidad se encuentra en las infecciones espermáticas o en las causas tóxicas.

- **Número de espermatozoides:** Es difícil o imposible de definir un valor por debajo del cual todos los hombres son infértiles. La concentración de espermatozoides se considera normal si el número de espermatozoides es superior a 20 millones/ml e inferior a 200 millones/ ml. Sin embargo el nivel de fecundidad es de 5 millones/ml. Entre 5 y 20 millones por ml, el porcentaje el embarazo es relativamente idéntico, pero el tiempo de espera es mayor (72,73). Se habla de oligozoospermia si el recuento es inferior a 20 millones/ml. Si la concentración es superior a 200 millones/ml, se habla de polizoospermia. La ausencia total de espermatozoides se denomina azoospermia (0 / ml). En caso de oligozoospermia, las causas pueden ser múltiples, pero a menudo son desconocidas. En caso de azoospermia, el estudio mínimo a solicitar tiene que incluir un cariotipo sanguíneo, una bioquímica seminal y un perfil hormonal que permita saber si la azoospermia es excretora, espermatogénesis normal pero obstaculizada en los conductos seminales, o secretora que es un defecto de la espermatogénesis.

- **Morfología:** el espermatozoide, en el estudio mediante microscopía óptica, está constituido por tres partes: cabeza, pieza intermedia y flagelo. Las anomalías se clasifican, por lo tanto, según su localización en anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o del flagelo.

- Cabeza (c): cabeza alargada, pequeña, macrocefalia, microcefalia, múltiple, anomalías de la base, anomalía del acrosoma.
- Pieza intermedia (p): presencia de un resto citoplasmático, pieza delgada o angulación.
- Flagelo (q): flagelo ausente, corto, de calibre irregular, enrollado o múltiple.

La valoración morfológica se basa en múltiples parámetros porque tiene en cuenta el conjunto de las anomalías del espermatozoide, ya que raramente se presentan aisladas. La evaluación se hace sobre 100 espermatozoides y permite calcular el IAM (índice de anomalías múltiples) o relación entre el número total de anomalías contadas y el número total de espermatozoides atípicos.

*IAM: Número total de anomalías / número de espermatozoides anormales*

Cuando el IAM es superior a 1.6 a menudo se observa una disminución de la fecundidad de los espermatozoides.

Si una misma anomalía afecta a todos los espermatozoides, se habla entonces de “síndrome puro”. Algunas anomalías morfológicas están correlacionadas directamente con la fertilidad. Por ejemplo, la ausencia de acrosoma en todos los espermatozoides es responsable de esterilidad.

### 1.7.3.2. Espermocultivo

Se lleva a cabo en busca de una infección que pudiera ser responsable de la alteración de los espermatozoides. Exceptuando los episodios agudos sintomáticos, una infección del espermatozoide frecuentemente pasa inadvertida y de ahí la importancia de solicitar un espermocultivo cuando están alterados ciertos parámetros. Está indicado en caso de pH básico, de hiperespermia (numerosos espermatozoides con el flagelo enrollado), de leucoespermia (>1 millón de leucocitos por ml), de astenoespermia y de antecedentes de infecciones. El cultivo es positivo si la concentración de gérmenes es > 1000 / ml con una leucoespermia (74).

### **1.7.3.3. Búsqueda de eyaculación retrógrada**

El bajo volumen o la falta de eyaculación debe sugerir una eyaculación retrógrada. El diagnóstico se realiza por el descubrimiento de los espermatozoides en la orina después de la eyaculación.

### **1.7.3.4. Estudio hormonal**

Un estudio hormonal es indispensable ante las siguientes situaciones: azoospermia, oligospermia grave ( $<5$  millones / ml), disfunción eréctil con disminución de la libido, evidencia clínica de patología endocrina y degradación de los parámetros del espermatozoides. En consecuencia, el estudio hormonal comprende las dosificaciones de FSH, LH, testosterona y prolactina. En caso de ginecomastia, se añade una dosificación de los estrógenos.

En la azoospermia y oligospermia severa, los niveles elevados de FSH indican una anomalía en la producción de espermatozoides por los testículos, es decir, un origen no obstructivo.

En caso de niveles bajos de testosterona se debe hacer una determinación de LH y prolactina (que puede afectar la producción de gonadotropinas y la testosterona). La *Inhibina B* refleja la función de la célula Sertoli y por lo tanto es un marcador más sensible que la FSH (75). También tiene un valor pronóstico antes de la biopsia testicular para evaluar la posibilidad de extracción de espermatozoides (76).

### **1.7.3.5. Bioquímica seminal**

El estudio del hombre infértil no estaría completo sin la exploración sistemática de los conductos espermáticos y de las glándulas anexas gracias a la dosificación de sus marcadores bioquímicos. Cada glándula posee un marcador específico, por ello si está afectada hay una disminución de la concentración del mismo. Además, esta disminución no es compensada al no existir mecanismos de regulación homeostática. Por todo ello, los marcadores permiten realizar una verdadera cartografía anatómica del aparato genital. La indicación de esta prueba se representa en la figura 13.

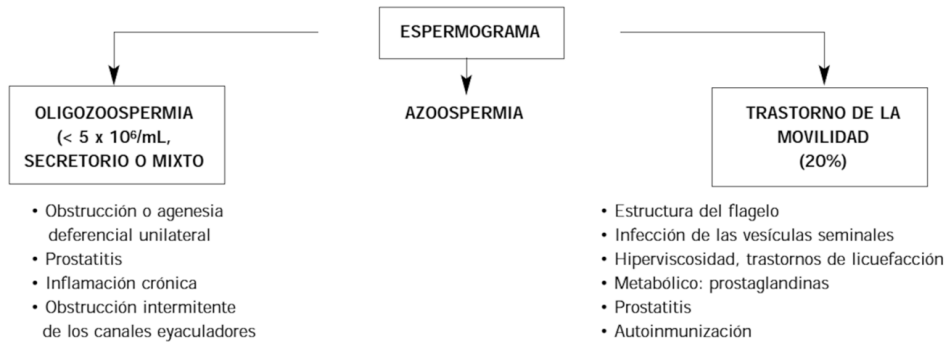


Figura 13. Indicaciones de la bioquímica seminal

#### 1.7.3.5.1. Marcadores del epidídimo:

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

La  $\alpha$ -1,4 *glucosidasa* es una hidrolasa que está en dos formas en el espermatozoide: una forma ácida de origen prostático y una neutra epididimaria. En el epidídimo desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides. Sólo es segregada en el cuerpo del epidídimo. Existe una débil secreción extraepididimaria, inferior a 10%.

#### 1.7.3.5.2. Marcador de las vesículas seminales:

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

#### 1.7.3.5.3. Marcador de la próstata:

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

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

## INTRODUCCIÓN

La *fosfatasa ácida* es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos. La isoenzima hallada en el esperma es específica de la próstata.

### 1.7.4. Estudios complementarios avanzados

**1.7.4.1. Anticuerpos antiespermatozoides y/o estudio de inmunidad.** Consiste en la búsqueda de anticuerpos antiesperma que puede ser directamente a través de la detección de anticuerpos en la superficie del espermatozoide o indirectamente, por la valoración de anticuerpos en el plasma seminal. Una autoinmunización antiesperma hay que sospecharla en todas las situaciones patológicas que permitan el paso de antígenos espermáticos a la sangre, como una intervención quirúrgica, un traumatismo o una infección de la esfera genital (Tabla 8). Pero muy frecuentemente no hay antecedentes evocadores. El estudio de inmunidad se realiza en caso de autoaglutinación de los espermatozoides (Fig.14). El diagnóstico de infertilidad inmunológico es sumamente probable cuando al menos el 50% de los espermatozoides son portadores de anticuerpos y la incidencia de infertilidad inmunológica sería del orden del 2 al 10%, según los autores (65).

OBSTRUCCIÓN	Vasectomía Agenesia del deferente Agenesia de vesículas seminales
INFECCIÓN	Orquitis ETS Prostatitis
TÉRMICO	Varicocele Criptorquidia
LESIÓN FÍSICA	Trauma Torsión Biopsia
GENÉTICA	Antígenos linfocitarios humanos

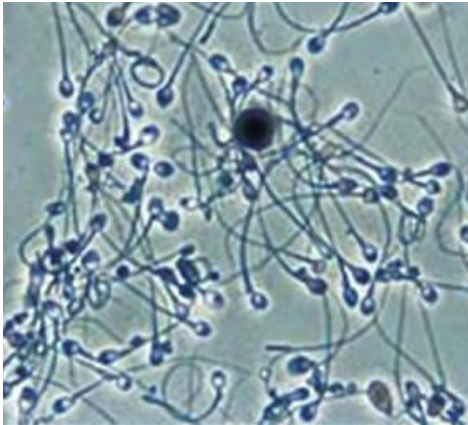


Tabla 8. Factores de riesgo para el desarrollo de anticuerpos antiespermatozoides.

Figura 14. Aglutinación espermática

### 1.7.4.2. Pruebas de fertilidad del esperma

Se representan en la tabla 9.

<b>PRUEBAS DE FERTILIDAD DEL ESPERMA</b>
1. Morfología estricta.
2. Capacitación del esperma.
3. Prueba de semen asistida por computadora CASA.
4. Prueba de estabilidad nuclear.
5. Prueba de reacción acrosomal.
6. Prueba de penetración del esperma.
7. Prueba de la unión de la hemizona.
8. Prueba de hinchamiento hipo-osmótico.
9. Prueba de interacción de semen y moco cervical.
10. Prueba de especies radicales de oxígeno.

Tabla 9. Pruebas de fertilidad del esperma

**1.7.4.2.1. Prueba de interacción moco cervical-esperma.** Estas pruebas permiten apreciar la aptitud de los espermatozoides para migrar en el moco y además, son esenciales en la evaluación de la calidad funcional de los espermatozoides.

La prueba de Hühner es un examen solicitado sistemática y precozmente en el estudio de la hipofertilidad de la pareja. Se trata de una prueba simple, no invasiva y barata. Aporta información sobre la calidad del moco cervical consecuencia de la secreción de estrógenos y de la calidad del movimiento flagelar de los espermatozoides. Las anomalías en la interacción moco-esperma son responsables del 5 al 15% de los casos de infertilidad (77). Esta prueba a menudo se practica como una prueba básica en el estudio de la infertilidad.

**1.7.4.2.2. Análisis del movimiento de los espermatozoides asistido por ordenador (CASA).** El objetivo es poner de manifiesto las anomalías del movimiento difícilmente visibles en la observación microscópica simple. Un espermatozoide presenta habitualmente un movimiento sinusoidal y su trayecto (Fig. 14) se caracteriza por los siguientes parámetros: amplitud del giro lateral de la cabeza respecto a la pieza intermedia (ALH); velocidad de progresión lineal en  $\mu\text{m/s}$  (VSL), velocidad curvilínea en  $\mu\text{m/s}$  (VCL), velocidad según el trayecto medio en  $\mu\text{m/s}$  (VAP) y linealidad del trayecto igual a la relación VSL/VCL.

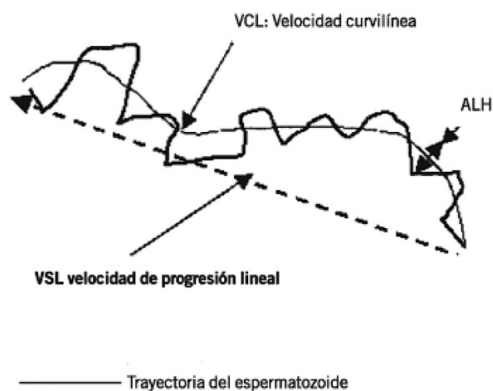


Figura 15. Movimiento sinusoidal y trayecto del espermatozoide.

**1.7.4.2.3. Estudio de la reacción acrosómica.** Este examen se practica en muy pocos laboratorios. Los espermatozoides capacitados tienen que ser capaces de efectuar la reacción acrosómica con el fin de penetrar en los ovocitos. Estudios científicos han demostrado la correlación entre la FIV y la tasa de reacción acrosómica, por lo que un fracaso en esta técnica puede ser secundario a una ausencia de reacción acrosómica (78, 79). Este examen se solicita en el caso de presencia en el espermiograma de un porcentaje importante de anomalías del acrosoma o después de un fracaso de la FIV.

**1.7.4.2.4. Prueba de fijación a la zona pelúcida.** Estas pruebas se correlacionan con la aptitud fecundadora de los espermatozoides. En la práctica, es una prueba difícil por el hecho de la dificultad de conseguir zonas pelúcidas humanas utilizables para una prueba. Se utilizan las zonas pelúcidas de los ovocitos en metafase II no fecundados in vitro. El interés de estas pruebas reside en la identificación de factores masculinos de infertilidad, particularmente en caso de fracaso de la FIV.

**1.7.4.2.5. Prueba de fecundación heteroespecífica.** Permite estudiar, por una parte, la interacción entre las membranas ovocitarias y la membrana del espermatozoide y por otra, la aptitud de los espermatozoides para desarticular su núcleo después de su penetración en un citoplasma ovocitario. Esta prueba está indicada para explicar un fracaso de la fijación en la FIV, pero actualmente se solicita cada vez más ante toda tentativa de FIV, cuando en el espermiograma hay numerosas anomalías de la cabeza de los espermatozoides. Si la prueba es negativa, evita un fracaso de fijación en la FIV convencional y está indicada la prueba ICSI (80).

**1.7.4.2.6. Pruebas para explorar la calidad del núcleo espermático.** El fenómeno de condensación o compactación del núcleo se desarrolla en la maduración del espermatozoide, al final de la espermogénesis y durante el tránsito epididimario. El estado de condensación y estabilidad del núcleo puede ser apreciado por diferentes métodos, uno de ellos la coloración de azul de anilina permite evaluar el grado de condensación de la cromatina. Algunos autores consideran que estas pruebas tienen un valor pronóstico con respecto a los resultados de la asistencia médica a la procreación (81).

### **1.7.5. Estudio genético:**

Las anomalías genéticas pueden ser causa de la infertilidad masculina, al afectar a la espermatogénesis o transporte de los espermatozoides.

**1.7.5.1. Anormalidades en el cariotipo.** El cariotipo es una de las primeras pruebas desarrolladas para evaluar la composición genética de un hombre infértil y debe ser ofrecido en las siguientes situaciones: azoospermia no obstructiva; oligospermia severa (<1 millón / ml) en varias muestras; y oligospermia con una historia de trastorno familiar de la reproducción. El diagnóstico más común de análisis de cariotipo es el mosaico o no-mosaico XXY (síndrome de Klinefelter), pero se identifican también anomalías numéricas, estructurales o inversiones en el cromosoma (82). Aproximadamente el 6% de todos los hombres infértiles tienen anomalías en su cariotipo, este porcentaje es superior en los hombres que tienen una anomalía en el recuento de espermatozoides (83).

**1.7.5.2. Mutaciones del gen de la fibrosis CFTR.** Si existe una agenesia unilateral o bilateral de los conductos deferentes o el epidídimo, es necesario el estudio del gen de la fibrosis quística dado que aproximadamente el 75% de los hombres con CBAVD presentan una mutación en al menos uno de los genes que codifican para la proteína CFTR, por lo que su presencia obliga a excluir esta enfermedad (63, 83). Las técnicas de reproducción asistida permiten a los hombres afectados tener sus propios hijos biológicos a través de la captura de sus espermatozoides a nivel de epidídimo.

**1.7.5.3. Microdeleciones del cromosoma Y.** Las microdeleciones del cromosoma Yq, fundamentalmente las localizadas en la región AZF, son la causa genética



## INTRODUCCIÓN

identificada más común de infertilidad masculina, siendo responsables de aproximadamente un 7.6% (31,32). La búsqueda de una microdelección se ofrece a los hombres que tienen una azoospermia no obstructiva, y/o en casos de oligospermia severa antes de la realización de una fecundación con técnica ICSI.

### 1.7.6. Prueba invasivas.

La biopsia testicular, hoy en día, no es sólo una prueba diagnóstica sino también terapéutica, de hecho, debe ir acompañada de una extracción y criopreservación de los espermatozoides (37).

### 1.7.7. Técnicas de imagen

#### 1.7.7.1. Ecografía

Los trabajos de Miskin y Bain describieron en 1974 la apariencia ultrasonográfica de los testículos en escala de grises (84). Desde entonces la tecnología ecográfica ha evolucionado mucho con la introducción de la ecografía en tiempo real, los transductores de alta frecuencia, el doppler en modo pulsado y en color. Estos avances han permitido que la ecografía sea el método más frecuentemente usado en la valoración del escroto (85,86). Las indicaciones de esta prueba se representan en la tabla 10.

INDICACIONES DE ECOGRAFÍA
1. Estudio del varicocele y su seguimiento tras los procedimientos terapéuticos
2. Valoración del volumen y de la estructura testicular.
3. Estudio y seguimiento de otras enfermedades que pueden asociarse a infertilidad: microlitiasis testicular, orquiepididimitis, infarto testicular, trauma testicular, tumores testiculares y del epidídimo, hernias, procesos obstructivos adquiridos y congénitos del tracto seminal.
4. Localización de los testículos no descendidos. Criptorquidia.
5. Estudio del patrón de flujo arterial testicular y espermatogénesis.

Tabla 10. Indicaciones de la ecografía en la patología testicular.

Las ventajas de la ecografía, aparte de su disponibilidad, portabilidad, bajo coste y no radiación, es que aporta una información anatómica y hemodinámica,

gracias a que permite valorar tanto el flujo sanguíneo arterial como venoso. Sus limitaciones son la dependencia de la calidad del equipo y de la experiencia del explorador. El examen debe de ser realizado en una habitación que garantice la intimidad del paciente y con una temperatura ambiente cálida para evitar el reflejo cremastérico, más pronunciado en niños, que puede provocar que el testículo se desplace superiormente, incluso fuera del saco escrotal. Se utilizan transductores lineales de alta frecuencia en el rango de 5 a 12 MHz y el paciente es colocado en posición supina con una toalla sobre sus muslos para apoyar el escroto. Se obtienen imágenes en cortes transversales y longitudinales de ambos testículos, preferiblemente comparativos y de la región inguinal. En el caso de detección de un tumor testicular, el estudio deberá extenderse al abdomen para una valoración completa. Es deseable que los ecógrafos doppler dispongan de modo “*power doppler*” debido a su mayor sensibilidad para detectar flujos lentos.

En ultrasonidos, el testículo normal es ligeramente ecogénico con una ecoestructura homogénea (Fig.16). El testículo está rodeado por una banda fibrosa, la túnica albugínea, que a menudo no se visualiza en ausencia de líquido escrotal. Sin embargo, la túnica se identifica como una estructura ecogénica que se invagina en los testículos para formar el mediastino. El testículo adulto normal es ovoide y mide 3 cm en la dimensión anteroposterior, de 2-4 cm en ancho y 3,5 cm de longitud. El tamaño y el peso de los testículos normalmente disminuyen con la edad. El epidídimo se encuentra posterolateral a los testículos y mide de 6-7 cm de longitud. En la ecografía, es iso- y/o hiperecoico al testículo con igual o menor vascularización. La cabeza es la parte mayor del epidídimo y la más fácil de identificar visualizándose en los cortes ecográficos parasagittales en posición superior y lateral el polo superior del testículo. El cuerpo y la cola del epidídimo son más pequeños y más variables en su posición.

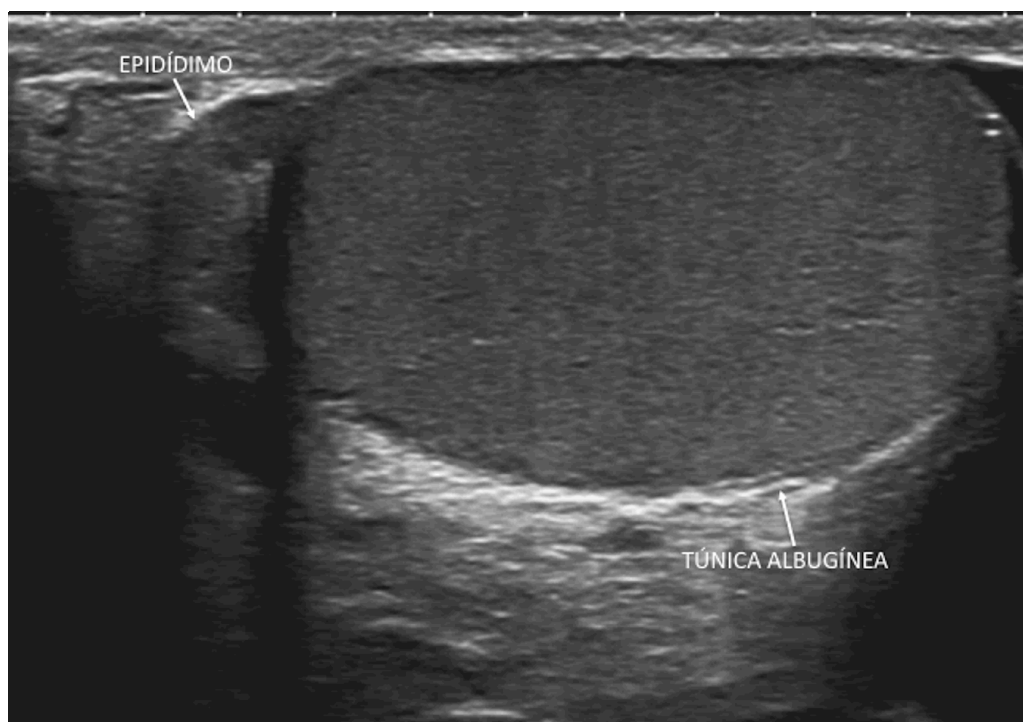


Fig.16. Representación de la anatomía testicular ecográfica.

### 1.7.7.2. Resonancia Magnética

La ecografía es la técnica de elección en la evaluación de la enfermedad escrotal. Sin embargo, la RM está indicada cuando los resultados ecográficos son ambiguos o no concluyentes (87-89), permitiendo reducir el número de procedimientos quirúrgicos innecesarios así como los costes (90).

Al igual que en ecografía, en la RM se coloca al paciente en decúbito supino con una toalla doblada entre las piernas del paciente para elevar el escroto y el pene. Se utiliza una antena de superficie y un imán de alto campo, comúnmente 1.5 teslas. El protocolo de imágenes consta de un FOV amplio en secuencias T2 desde el origen de los vasos renales hasta los testículos con el fin de evaluar el canal inguinal, la presencia de hernias y ascitis así como el drenaje linfático de los testículos. Se usa posteriormente secuencias espín-eco T2 de alta resolución en los planos axial, sagital y coronal sobre el escroto. Las secuencias gradiente-eco T1 (GRET1) se utilizan para identificar la hemorragia. La administración de gadolinio no es de rutina, pero se realiza en casos seleccionados con el fin de ayudar en la diferenciación entre una lesión benigna quística y una neoplasia quística y/o evaluar las áreas de testículo con perfusión ausente o reducida como en los infartos segmentarios (91). Cuando se

emplea contraste el protocolo incluye una secuencia GRE-T1 con saturación de grasa pre y post gadolinio en plano axial y coronal.

En la RM, el testículo tiene una apariencia homogénea, con una intensidad de señal intermedia en T1 y alta intensidad de señal en imágenes potenciadas en T2 comparado con el músculo (Fig. 17). La relativamente alta intensidad de señal de los testículos en las imágenes potenciadas en T2 permite un excelente contraste de las lesiones sólidas, que siempre muestran una baja señal. Las secuencias T1 son útiles para detectar el aumento de intensidad de señal en ciertos tejidos, tales como la grasa y la metahemoglobina. La túnica albugínea aparece como baja intensidad de señal en las imágenes ponderadas en T1 y T2. El epidídimo tiene una intensidad de señal de características similares al parénquima testicular en T1, pero menor intensidad de señal en imágenes potenciadas en T2 (92).

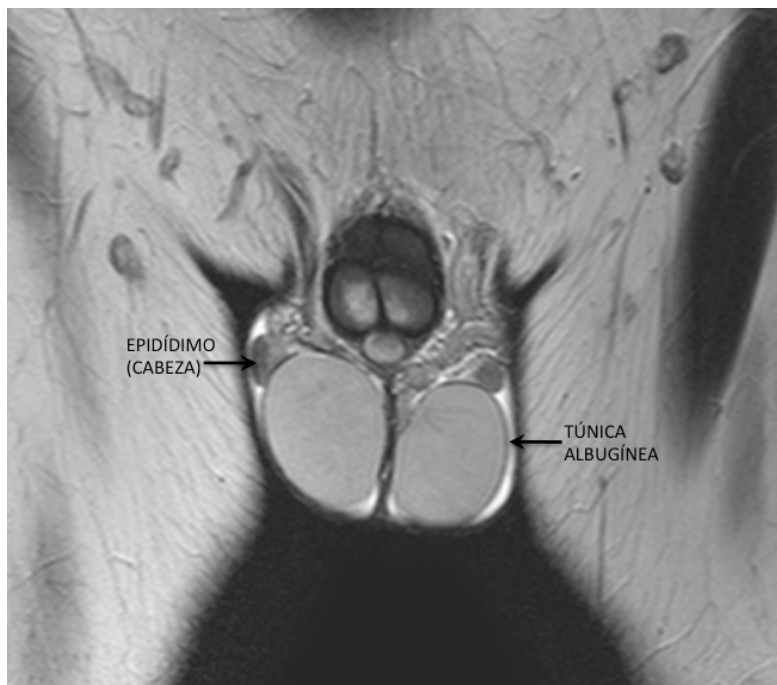


Figura 17. Imagen de RM en secuencia potenciada en T2 y plano coronal que muestra el parénquima testicular, la túnica y la cabeza del epidídimo.

**1.7.7.3. Espectroscopía:** Se desarrollará como un capítulo independiente.

### 1.8. ESPECTROSCOPIA

La espectroscopía por resonancia magnética (ERM) permite la exploración *no invasiva y en vivo* de la composición molecular de los tejidos. Esta técnica permite la identificación de diversos componentes moleculares (metabolitos) involucrados tanto en los procesos fisiológicos como patológicos. A pesar de que la espectroscopía puede realizarse usando diferentes núcleos magnéticamente activos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , nos centraremos en la espectroscopía del núcleo de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ), con mucho, el más ampliamente estudiado y con mayores aplicaciones clínicas en el momento actual en áreas ya demostrada como cerebro, próstata y mama (93).

La espectroscopía por resonancia magnética basada en el  $^1\text{H}$  (o ERM- $^1\text{H}$ ) tiene tres ventajas fundamentales e importantes:

- La abundancia de protones de  $^1\text{H}$  de forma natural en los tejidos evita la necesidad de utilizar sustancias radiactivas para su realización.
- Puede realizarse en la mayoría de las máquinas de resonancia magnética utilizadas para la evaluación clínica de pacientes.
- Es altamente sensible debido al gran rango giromagnético de los protones naturales.

#### 1.8.1. Fundamentos físicos de la espectroscopía

##### 1.8.1.1. Propiedades del átomo.

La materia está compuesta por átomos. Éstos son estructuras compuestas de núcleo y corteza. El núcleo está integrado por protones con carga eléctrica positiva y neutrones sin carga, alrededor del núcleo giran los electrones (carga negativa) en nubes orbitales en perfecto equilibrio (debido a que tienen el mismo número de cargas que el núcleo). Cuando los núcleos tienen un número impar de protones poseen la capacidad de girar continuamente sobre su eje sin desplazarse, a este movimiento de giro se le llama espín.

Aunque se podría realizar RM de los isótopos de fósforo, sodio y de todos los átomos cuya suma de protones y neutrones es impar, se utiliza mayoritariamente el isótopo de hidrógeno dada su abundancia en el organismo y poseer únicamente un protón. Como el protón tiene una carga eléctrica, su movimiento genera una corriente

eléctrica que a su vez crea un campo magnético llamado **momento magnético** y se representa por un vector de imantación  $\mu$ .

El protón posee dos propiedades:

*Propiedades mecánicas:* Gira sobre sí mismo, rota en función del momento angular, que depende también del entorno bioquímico, en la misma dirección que su eje de rotación. Se representa por el vector espín “s”.

*Propiedades magnéticas:* es un pequeño imán, su momento magnético está definido por la dirección y fuerza del eje de rotación. Se representa por el vector de imantación  $\mu$ .

Estas dos propiedades están interrelacionadas ya que el vector de imantación es diferente para cada núcleo según la fórmula:

$$\mu = \gamma \cdot s.$$

En dicha fórmula,  $\gamma$  es la constante giromagnética, que a su vez depende de la carga y de la masa de cada elemento. Por su importante momento magnético intrínseco el protón de hidrógeno es un elemento adecuado para el fenómeno de la RM.

En el organismo, en ausencia de cualquier fuerza externa (campo magnético), los momentos magnéticos de los protones en un tejido se orientan de forma aleatoria, el  $\mu$  de los protones apunta en todas las direcciones del espacio y sus fuerzas se anulan unas con otras y por ello no estamos magnetizados. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la figura 18, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ .

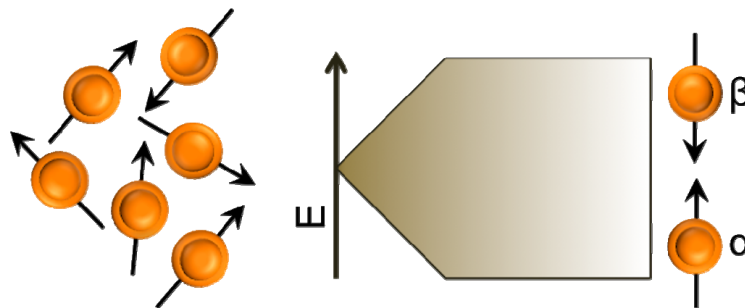


Figura 18. Posición de los espines bajo la influencia de un campo magnético

## INTRODUCCIÓN

Existen más núcleos en el estado de espín  $\alpha$  que en el espín  $\beta$  pero aunque la diferencia de población no es enorme sí que es suficiente para establecer las bases de la espectroscopía de RM. La diferencia de energía entre los dos estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ , depende de la fuerza del campo magnético aplicado  $B_0$ . Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. En la figura 19 se representa el aumento de la diferencia energética entre los estados de espín con el aumento de la fuerza del campo magnético.

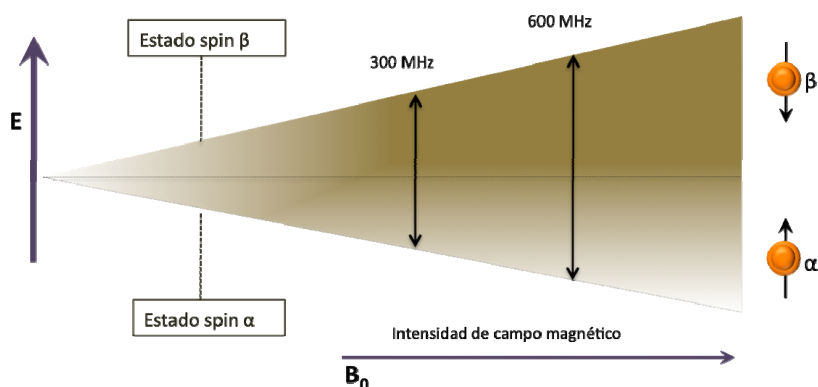


Figura 19. Influencia del campo magnético en el estado de los espines.

### 1.8.1.2. Absorción de energía y precesión.

Tanto la obtención de imágenes por RM como la ERM- $^1\text{H}$  se basan en la propiedad que presentan ciertos núcleos atómicos para absorber selectivamente la energía de radiofrecuencia cuando se someten a un campo magnético (fenómeno de resonancia). El exceso energético que se deriva de este fenómeno es liberado por los núcleos mediante un proceso de relajación nuclear.

La frecuencia a la que se produce este proceso (o frecuencia de precesión,  $\omega$ ) (Fig. 20) es directamente proporcional al valor del campo magnético efectivo ( $B_0$ ) que percibe el núcleo, según viene definido por la ley de Larmor:

$$\omega = \gamma \cdot B / 2 \pi$$

Dónde  $\gamma$  es la constante giromagnética del núcleo considerado y  $B_0$  es el campo magnético efectivo.

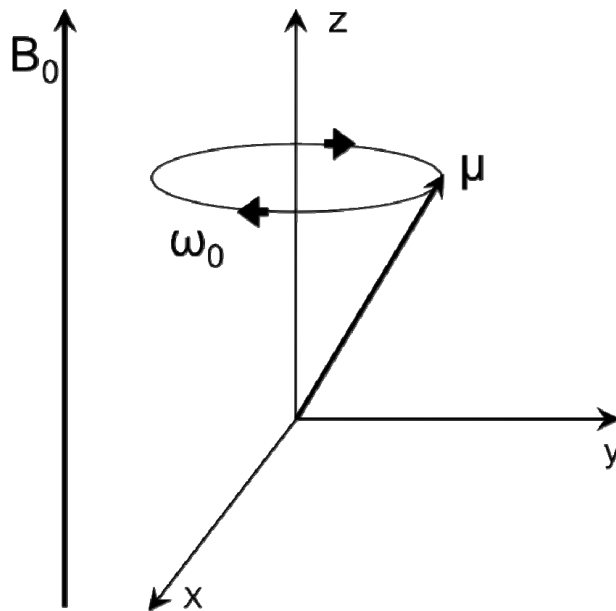


Figura 20. En un campo magnético el vector del espín precesiona en torno al campo magnético (eje z). Las componentes en el plano x-y varían con el tiempo a la frecuencia  $B_0$  llamada frecuencia de resonancia de Larmor ( $\omega$ )

El campo magnético efectivo ( $B_0$ ) viene determinado por un campo magnético externo ( $B_{\text{ext}}$ ), constituido a su vez por el campo magnético producido por el imán y los gradientes, y un campo magnético “interno”, denominado campo magnético local ( $B_{\text{local}}$ ), que está inducido por cargas en movimiento que forman parte de las diferentes moléculas.

$$B_0 = B_{\text{ext}} + B_{\text{local}}$$

En cualquier molécula, la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo (efecto diamagnético). El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. El  $B_{\text{local}}$  es proporcional al campo magnético externo a través de una constante que recibe el nombre de constante de apantallamiento ( $\sigma$ ).

$$B_0 = B_{\text{ext}} (1 - \sigma)$$

Si sustituimos estos valores en la ecuación de Larmor nos encontramos que:



$$\omega = \gamma \cdot B_{\text{ext}} (1 - \sigma) / 2 \pi$$

Dado que  $\gamma$  es la constante giromagnética, constante para cada núcleo considerado, y el campo magnético externo ( $B_{\text{ext}}$ ) será constante para cada experimento, tenemos que la frecuencia de precesión dependerá, en último término, de la constante de apantallamiento ( $\sigma$ ). Esta constante no dependerá únicamente del núcleo considerado, sino que será característica para la estructura electrónica de su entorno y en consecuencia será característica de la molécula en que esté presente. Este efecto es conocido como desplazamiento químico o *chemical shift*.

### 1.8.1.3. Desplazamiento químico o *chemical shift*:

Durante el desarrollo de la RM, se descubrió que los núcleos en los diferentes medios celulares resuenan con frecuencias ligeramente diferentes (94). El desplazamiento químico corresponde a un cambio en la frecuencia de resonancia de los núcleos dentro de las moléculas en función de sus enlaces químicos. La presencia de una nube de electrones constituye un blindaje electrónico que reduce ligeramente el campo magnético  $B_0$  a la que el núcleo normalmente se somete. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo ( $B_{\text{ef}}$ ) que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo  $B_0$ , y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor.

$$B_{\text{ef}} = B_0 - B_{\text{loc.}}$$

Si todos los protones ( $^1\text{H}$ ) de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes al pertenecer a diferentes estructuras orgánicas o químicas y, por tanto, se encuentran diferentemente protegidos o apantallados. Por ejemplo, no será igual la  $\sigma$  del núcleo  $^1\text{H}$  presente en el grupo metil del lactato (Fig.21a) o de la colina (Fig.21b). En el caso de la colina, el grupo metil se encuentra adyacente a un átomo de N, que es más electronegativo que el átomo de C que se encuentra adyacente al grupo metil del lactato. El átomo de N, debido a su electronegatividad ejercerá cierta atracción sobre los electrones del grupo metil adyacente. Éste se encontrará más desposeído de su nube electrónica y, por lo tanto,

menos apantallado. En consecuencia, la frecuencia de resonancia del grupo metil de la colina estará desplazada a valores más altos que el grupo metil del lactato como se representa en la figura 22.

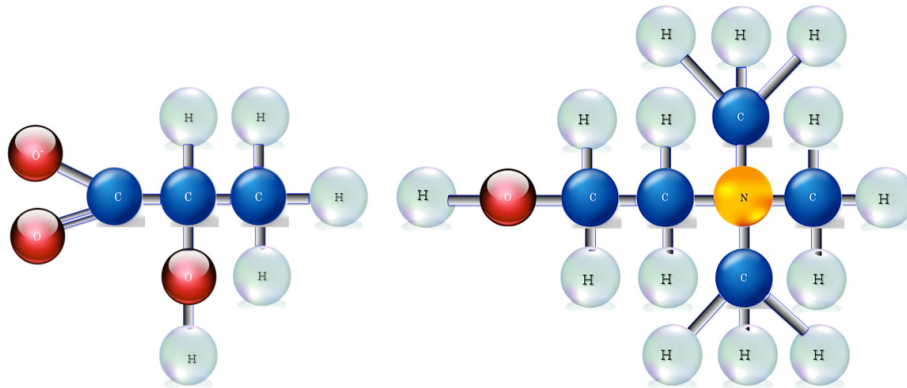


Figura 21a (imagen de la izquierda). Estructura molecular del lactato y Figura 21b (imagen de la derecha). Estructura molecular de la colina. Los protones de sus grupos metil (CH<sub>3</sub>) sufren menor apantallamiento que los del lactato por la mayor electronegatividad del N central.

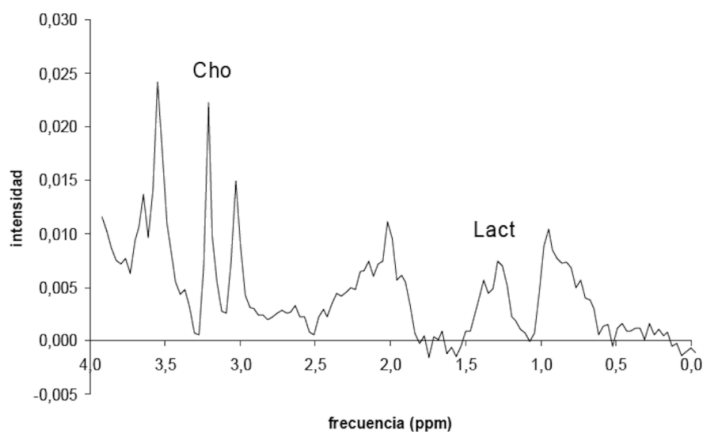


Figura 22. Espectro en el que se identifica la diferente posición de un 1H incluido en un grupo metil del lactato (Lact) respecto otro incluido en la molécula de colina (Cho).

Por lo general, los efectos de protección o apantallamiento de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RM. Así pues, un espectro de RM es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética, que tienen lugar

## INTRODUCCIÓN

debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades  $\delta$  ó ppm).

En la práctica, es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe con suficiente exactitud para distinguir protones individuales ya que las absorciones sólo varían en unas pocas milésimas. Un método más exacto para expresar desplazamientos químicos es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra.

La diferencia en la intensidad del campo magnético necesario para la resonancia de los protones de la muestra y de los protones de referencia se puede medir, ahora sí, con mucha exactitud.

$$\delta \text{ (ppm)} = \nu_{\text{muestra}} - \nu_{\text{referencia}} / \nu_{\text{referencia}} \times 10^6$$

$\nu$ =frecuencia de resonancia

El valor de esta variable es muy pequeño, y por ello se expresa multiplicado por  $10^6$ , en unidades de partes por millón (ppm). Esta variable no tiene dimensión. La principal ventaja respecto a la valoración en Hz es que el desplazamiento químico no depende del campo magnético, únicamente depende de la constante de apantallamiento  $\sigma$ . Así pues, el desplazamiento químico identifica el compuesto en el que se encuentra el núcleo, de manera que la escala de desplazamiento químico permite la identificación de los diferentes compuestos presentes en la muestra analizada.

En la práctica, para cada núcleo existen una serie de compuestos de referencia a partir de los cuales se tabula la posición de los demás. En la ERM- $^1\text{H}$ , una de las referencias más utilizadas históricamente en el terreno de la bioquímica es el tetrametilsilano (TMS) que se corresponde con la fórmula  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ . Este compuesto no se encuentra en los organismos vivos, pero se ha respetado como referencia para los estudios ERM- $^1\text{H}$  realizados “*in vivo*”. A la posición de resonancia de este compuesto se le asigna el valor de 0 ppm y su “ $\nu_{\text{muestra}}$ ” se utiliza como su “ $\nu_{\text{referencia}}$ ”. Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados. Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de RM aparecen a

campos más bajos (hacia la izquierda de la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo desplazamiento químico dando una única absorción intensa. La escala más común de desplazamiento químico es la escala  $\delta$  (delta) en la que la absorción del TMS se define como 0.00  $\delta$ . La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala  $\delta$  aumenta hacia los campos menores (Fig. 23). La mayoría de los compuestos estudiados por ERM- $^1\text{H}$  absorben por debajo de la señal del TMS, por lo que normalmente no hay interferencia entre la referencia y la muestra.

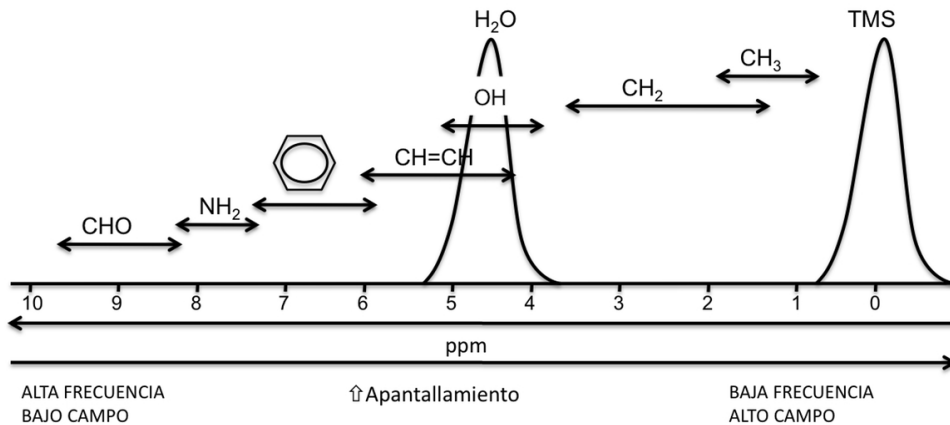


Figura 23. Escala típica del desplazamiento químico  $^1\text{H}$  para diferentes grupos funcionales. La resonancia del  $\text{H}_2\text{O}$  y la resonancia del TMS se sitúan a 4.7 y 0 ppm respectivamente.

Un espectro se representa con:

- Un eje de abscisas: posición de los metabolitos en función de su desplazamiento químico. El TMS se utiliza como referencia del origen del eje, que es convencionalmente a 0 ppm. Este eje está orientado de derecha a izquierda.
- Una ordenada: que representa la amplitud de pico. El área bajo la curva es proporcional a la concentración de metabolitos. El ancho del pico es inversamente proporcional al tiempo de relajación  $T_2^*$ .

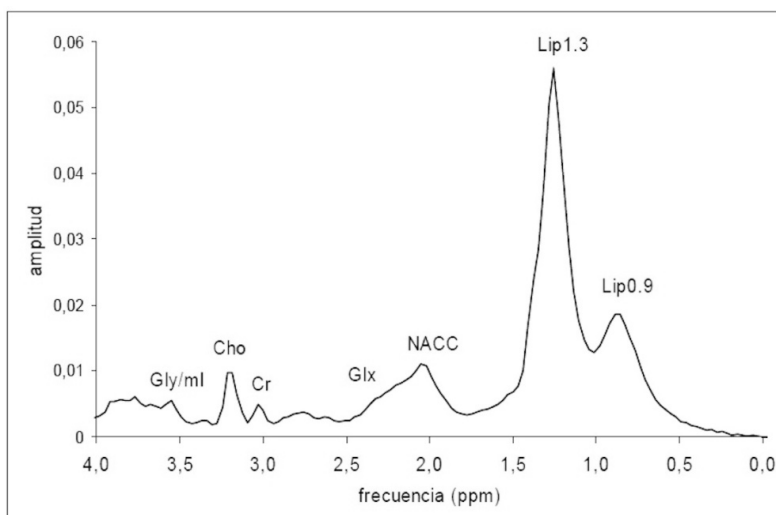


Figura 24. Representación de una espectroscopía.

#### 1.8.1.4. Constante de acoplamiento espín-espín

La interacción entre los núcleos atómicos de los grupos químicos vecinos traduce como cada pico se transforma en un pico complejo bien en un doblete, triplete o múltiple: se trata del fenómeno de acoplamiento espín-espín. La distancia entre estos picos (medida en Hertzios) tiene un valor de frecuencia fija (Hz) independiente de la amplitud del campo magnético y se le llama constante de acoplamiento  $J$ .

#### 1.8.1.5. Transformación espectroscópica de Fourier

Para obtener la señal del vóxel, el aparato de resonancia envía una serie de pulsos que excitan selectivamente los  $^1\text{H}$  del área de interés seleccionada, y recibe la señal enviada por los mismos al relajarse, por medio de una antena receptora. Este proceso se repite un número de veces determinado y el resultado final será el promedio de la señal obtenida con todos los pulsos. Con ello, se obtiene una gráfica que nos muestra la evolución de la señal (corriente eléctrica) respecto al tiempo, denominada FID (“*free induction decay*”). La información que nos ofrece la FID está constituida por la suma de los sinusoides de relajación de los múltiples protones incluidos en el vóxel (Fig.25). Mediante el procesado y análisis de la FID se pretende evaluar el número de sinusoides que la componen y la amplitud de cada uno. La amplitud de la senoide está relacionada con la concentración de núcleos y la frecuencia de cada una de ellas viene determinada por el campo magnético efectivo

que recibe cada uno de los componentes (que dependerá de su constante de apantallamiento),

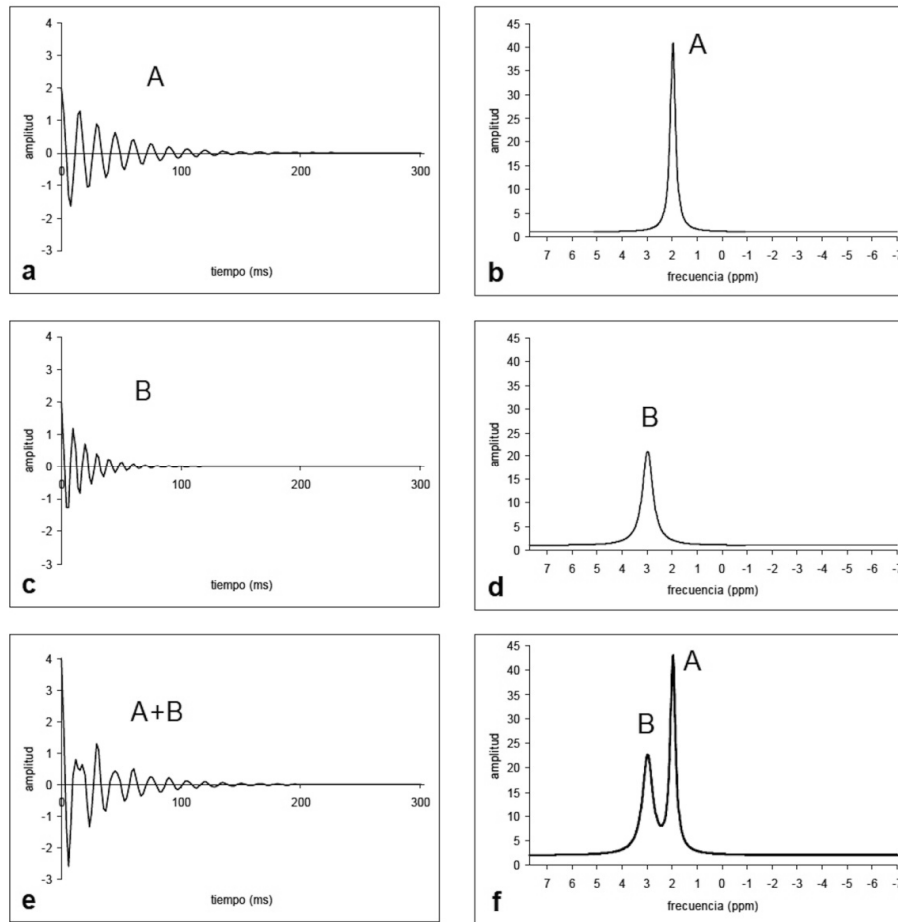


Figura 25. Proceso de formación del espectro. Espectros obtenidos mediante un programa específico que permite simular espectros (programa jMRUI). La figura 25e muestra una FID que sería la resultante de la suma de las FIDs mostradas en 25a y 25c. Al realizar la transformada de Fourier (TF) de esta FID obtenemos la figura 25f (suma de las figuras 25b y 25d) que nos da una representación del espectro según la cantidad de señal a cada frecuencia y su intensidad relativa.

## 1.8.2. Técnica espectroscópica

### 1.8.2.1. Tipo de secuencias: PRESS y STEAM

Al igual que en la RM, en la espectroscopía también se utilizan secuencias de adquisición, que consisten en una serie de pulsos de radiofrecuencia y de gradientes de campo magnético que se activan a tiempos determinados para obtener la señal de

## INTRODUCCIÓN

resonancia. Los factores claves para obtener una espectroscopía de óptima calidad son la correcta elección de los pulsos y de los parámetros de adquisición. Existen dos métodos básicos usados en espectroscopía: STEAM (*stimulated echo acquisition mode*) y PRESS (*point resolved spectroscopy*)

La técnica STEAM genera un vóxel cúbico o rectangular tras la obtención de un eco estimulado con tres pulsos selectivos de  $90^\circ$ . La utilización de estos pulsos da lugar a un vóxel bien delimitado dentro de la muestra. Esta técnica hace posible que se minimice la contaminación de la señal por el ambiente externo a la región de interés. La segunda técnica, PRESS, también genera un vóxel cúbico o rectangular tras la obtención de un eco espín mediante la adquisición de un pulso de  $90^\circ$  seguido por otros dos de  $180^\circ$ .

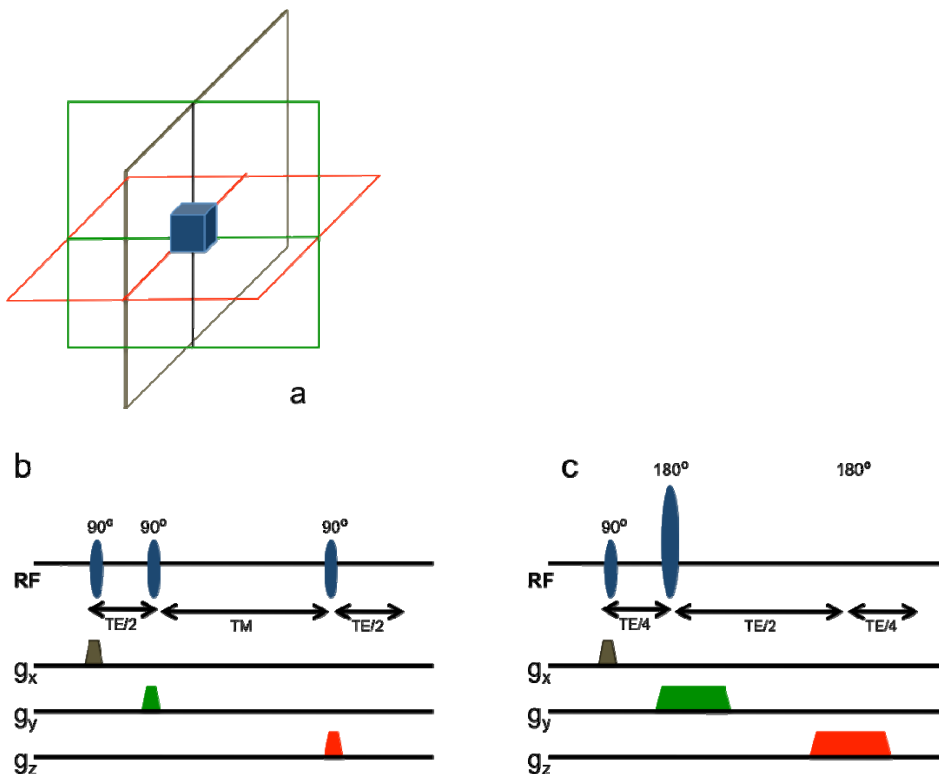


Figura 26. Representación del tipo de secuencias comúnmente utilizadas en espectroscopía de vóxel único. La localización espacial se obtiene agrupando las señales de la intersección de tres pulsos de secuencias selectivos aplicados en planos ortogonales (a). La secuencia STEAM consiste en tres pulsos selectivos de  $90^\circ$  (b), la secuencia PRESS consiste en un pulso de  $90^\circ$  seguido de dos pulsos de  $180^\circ$  (c).

El vóxel generado por PRESS no queda tan bien definido como con la técnica STEAM, sin embargo resulta mejor en cociente señal /ruido. Ambas técnicas necesitan que se suprima la señal de agua que se encuentran en sus vóxeles, por lo general se usa la técnica CHESS (*chemically selective saturation*), que se aplica antes de la localización seleccionada, por medio de tres pulsos de frecuencia selectiva con un gradiente de desfaseamiento para suprimir el agua. La mayoría de las técnicas fallan por la inadecuada supresión del agua, que surge mientras se muestran regiones inhomogéneas. La ERM posee mayor sensibilidad que la RM convencional a las heterogeneidades del campo magnético. Por ello, la ERM requiere el uso de un proceso de calibración conocido como *shimming*, que mejora el campo magnético global y local.

En resumen, las características del método STEAM incluyen el que pueda ser realizado con tiempo de eco (TE) cortos, que exista recuperación incompleta de la señal y que necesita un volumen preciso (vóxel). Las características del método PRESS incluyen el que pueda ser realizado con tiempo de eco cortos y largos y que la señal se recupera completamente.

#### **1.8.2.2. Vóxel único o multivóxel**

Dentro de las técnicas de espectroscopía, se puede elegir entre secuencias de vóxel único y secuencias multivóxel. Las secuencias multivóxel presentan la ventaja de poder estudiar en una misma sesión las características metabólicas de múltiples vóxeles. En una primera valoración, esto las haría de elección en cualquier situación. No obstante, presentan una serie de inconvenientes a tener en cuenta. En primer lugar, cuanto mayor es el área a estudiar, mayores son las dificultades técnicas para obtener un registro de calidad. A efectos prácticos, la calidad del registro será menor, tanto en relación señal/ruido, como en homogeneidad del campo y definición de los picos. En segundo lugar, el tiempo de adquisición es mayor en las secuencias multivóxel. En tercer lugar, el método de localización que utilizan estas secuencias es menos preciso que en secuencias de vóxel único, con pérdida de señal por el método utilizado, y contaminación desde vóxeles vecinos. Por último, el procesamiento de los registros es más largo y está menos automatizado. En la práctica, cuando la región a estudiar está claramente definida será de elección la realización de secuencias de vóxel único por su mayor calidad y rapidez en cuanto a obtención y procesado. El vóxel debe de ser



## INTRODUCCIÓN

colocado lejos de los artefactos de susceptibilidad y de los lípidos. Cuando se desea valorar diferentes regiones a la vez o el área a estudiar no está claramente definida serán de elección las secuencias multivóxel al obtener una mejor valoración espacial.

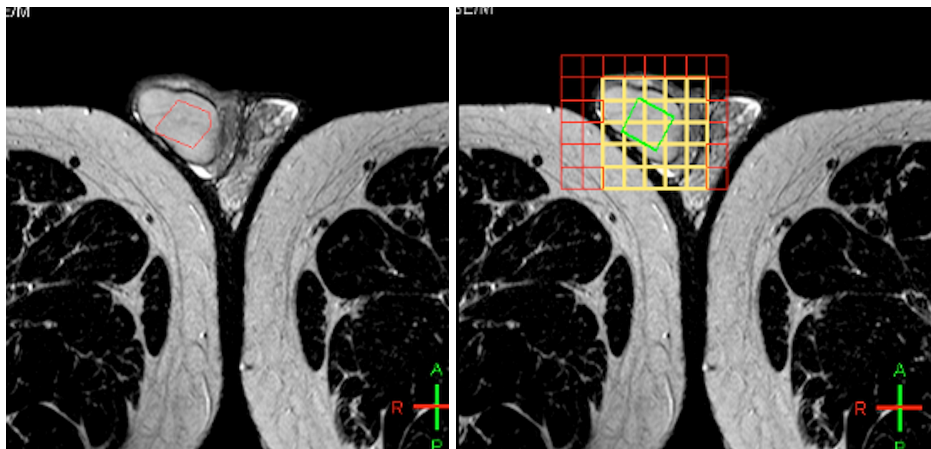


Figura 27. Representación de un vóxel único y multivóxel en el estudio del parénquima testicular

### 1.8.2.3. Tiempo de Eco

Similar a la resonancia magnética convencional la información depende de las condiciones de la técnica, en particular el tiempo de repetición (TR) y tiempo de eco (TE) empleados, debido a que los metabolitos tienen diferentes tiempos de relajación en T1 y T2. Para optimizar la adquisición del espectro se pueden variar diferentes parámetros. La modificación de estos parámetros influirán no sólo en la apariencia del espectro, sino también en la información que puede ser extraída.

Uno de los más relevantes es el tiempo de eco (TE). En la actualidad, el TE usado “*in vivo*” por la mayoría de grupos varía entre 18 y 288 ms. A este respecto, se habla de estudios con TE corto o largo, utilizando la mayoría de estudios con TE corto un TE entre 18 y 45 ms. y los estudios con TE largo entre 120 y 288 ms. Se han planteado diferentes argumentos a favor y en contra de cada opción.

Un TE largo permite observar un número reducido de metabolitos con menor distorsión de la línea de base. El resultado es un espectro más sencillo de procesar, analizar e interpretar.

Por otro lado, en TE corto son visibles un mayor número de resonancias debido a que la señal de compuestos con fuerte modulación puede perderse a TE

largo. De esta manera, es necesario un TE corto para mejor valoración de algunos compuestos como por ejemplo lípidos, mioinositol, glutamina o glutamato.

### **1.8.3. Análisis de un espectro y metabolitos**

El análisis de un espectro nos proporciona información sobre los compuestos presentes, sus niveles y su entorno (95). Para ello se estudian:

- La posición de la resonancia, que nos permite identificar el compuesto que origina la señal.
- El área bajo cada resonancia, que es proporcional al número de núcleos que contribuyen a la señal con lo cual, se pueden calcular las concentraciones de los metabolitos presentes.
- La nitidez de cada pico del espectro, en la que influyen varios factores. Siendo los más importantes la homogeneidad del campo magnético externo y el tiempo de relajación transversal o T2, siendo más estrecho el pico del espectro cuanto más prolongado es el T2.

La idea central del uso de ERM-<sup>1</sup>H en pacientes es la de determinar qué tipo de sustancias se encuentran en un área anatómica específica y cómo cambia su concentración en diferentes zonas o condiciones fisiológicas. La señal preponderante en los tejidos es la del agua, ya que es el metabolito más abundante. Además del agua, en ERM se pueden detectar otros metabolitos que son indicadores de procesos enfermos y que pueden evaluar incluso la efectividad de ciertos tratamientos. Para poder detectarlos, primero es necesario suprimir la señal del agua (que dada su abundancia interferiría con la señal de otras sustancias presentes únicamente en pequeñas concentraciones), esto se logra a través de una secuencia de pulsos específica. En la tabla 11 se muestran algunos de los metabolitos y sus correspondientes desplazamientos químicos detectados en el ser humano mediante ERM-<sup>1</sup>H.

ppm	Metabolitos
0.8-1.1	Leucina (Leu),Isoleucina, Valina(Val)
<b>0.8-2.5</b>	<b>Ácidos grasos (Lip)</b>
1.15	Propilenglicos,etanol
1.3	Ácido Láctico (Lact)
1.45	Alanina (Ala)
1.85	Ácido Acético (Ac)
2.02	N-acetil aspartato
2.1-2.5	Acido glutámico (Glu)
2.25	GABA
<b>2.6</b>	<b>N-acetil aspartato ,Cittrato(Cit)</b>
2.8	Ácido Aspártici
<b>3.02</b>	<b>Creatina (Cr),Fosfocreatina(Pcr)</b>
<b>3.2</b>	<b>Colina,fosforilcolina,glicerofosforilcolina</b>
3.3	Taurina(Tau)
3.4	Glucosa (Glc)
3.55	Myo-inositol(MI),glicina(Gly)
3.6-3.8	Ácido gñutámico,glutamina
3.5-4	Arabitol,ribitol
3.8	Glucosa,manitol
3.9	Creatina, fosfocreatina
5.3-5.7	Ácidos grasos
7.3	Fenilalanina

Tabla 11. Desplazamiento químico de los principales compuestos que se pueden detectar en los diferentes tejidos mediante ERM-1H.

En lo que concierne a nuestro estudio del testículo, tan sólo abordaremos la determinación de una serie de metabolitos detectados en el parénquima testicular:

- **Colina (Cho, pico 3,2 ppm).** El pico de la Cho está conformado por la aportación de distintos metabolitos que la contienen como fosfocolina, glicerofosfocolina y fosfatidilcolina. Los derivados de colina detectables espectroscópicamente son compuestos íntimamente relacionados con la síntesis o destrucción de la membrana celular, por lo que el incremento de Cho probablemente refleja la proliferación celular (96, 97).

- **Creatina (Cr):** Compuesto por creatina, fosfocreatina y, en menor grado, por ácido  $\gamma$ -aminobutírico, lisina y glutatión (97). El pico aparece a 3.03 ppm., pero pudiendo encontrarse un pico adicional a 3.94 ppm. Estos compuestos son ampliamente conocidos como metabolitos implicados en el suministro energético celular. Las concentraciones de Cr son relativamente constantes y tienden a ser resistentes a los cambios por lo que se utilizan de referencia para cocientes metabólicos (NAA/Cr, Cho/Cr, etc) (94,98). La Cr se relaciona con la homeostasis de la bioenergética celular como elemento de reserva de fosfatos de alta energía en el citosol de músculos y neuronas (96), aumenta en los estados de hipometabolismo y disminuye en el hipermetabolismo (97).
- **Lípidos (LipX):** Compuestos por ácidos grasos no saturados, sus distintos picos se sitúan a 0.9, 1.2, 1.5 y 6.0 ppm y se observan sólo si se emplean TE cortos (97). La señal de metileno a 1,3 ppm, y la señal de metilo en 0,9 ppm, se originan respectivamente a partir de los grupos CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, en cadenas de ácidos grasos de triglicéridos que forman gotitas móviles de lípidos en el citoplasma de las células o en el espacio intercelular. Los lípidos de la membrana celular no contribuyen a estas señales debido a su baja movilidad.

#### 1.8.4. Aplicaciones clínicas.

La resonancia magnética y la espectroscopía han tenido importantes avances en los últimos 30 años. Hoy en día, la resonancia magnética se ha consolidado como la única técnica de imagen disponible en la práctica radiológica que aporta información anatómica y metabólica de los tejidos. Hasta el año 2004, el principal procedimiento diagnóstico que se utilizaba para detectar cambios metabólicos asociados con los procesos tumorales era el PET (tomografía por emisión de positrones), sin embargo desde ese año, gracias a un taller de resonancia magnética sobre investigación traslacional en el cáncer patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU. (NCI), la ERM<sup>1</sup>H se implementó como un método diagnóstico en la patología tumoral de cerebro, próstata y mama (93). La tendencia actual de la

## INTRODUCCIÓN

imagen médica es hacia una evaluación tanto de la anatomía como de la función y de la composición molecular de los tejidos.

En la valoración anatómica o estructural del SNC (sistema nervioso central), la RM ocupó siempre un lugar destacado. El empleo de nuevas técnicas de imágenes no invasivas como la ERM-<sup>1</sup>H ha logrado caracterizar patrones tumorales gracias a los picos metabólicos detectados como por ejemplo en los astrocitomas de alto grado (99-101). Por otra parte, su alta sensibilidad para diferenciar el parénquima encefálico normal de las lesiones neoplásicas permite localizar las zonas con mayores alteraciones bioquímicas y de mayor densidad de células tumorales con el fin de definir con mayor exactitud los límites de la infiltración tumoral, guiar biopsias estereotáxicas y resecciones tumorales selectivas (102,103)

Así mismo, la ERM-<sup>1</sup>H evidencia disfunciones metabólicas encefálicas, incluso antes de que se manifiesten como alteraciones de señal en las imágenes anatómicas como por ejemplo en la esclerosis múltiple, epilepsia y demencia tipo Alzheimer (104-110). En algunos tumores cerebrales, en la demencia asociada al VIH y en las enfermedades metabólicas, permite verificar la eficacia del tratamiento (97, 108), y se ha demostrado una relación de los hallazgos de la ERM-<sup>1</sup>H con el pronóstico funcional en la esclerosis múltiple y en los infartos encefálicos (111,112).

En la próstata, se ha demostrado que la información anatómica de la RM junto con la metabólica de la espectroscopía permiten identificar la extensión espacial del cáncer dentro de la glándula, observando cambios metabólicos en los marcadores prostáticos, como el citrato, creatina y colina. Las variaciones en las concentraciones de estas sustancias pueden confirmar la presencia de tumor dentro de la zona periférica de la próstata (113-116).

En la mama, el principal método de detección en el diagnóstico de cáncer es la mamografía, aunque esta técnica tiene una alta sensibilidad (70-90%) para la detección de tejido patológico dentro de la glándula mamaria, especialmente en mamas con alta densidad, tiene una baja especificidad (32-64%) (117). Diferentes estudios han demostrado que la ERM-<sup>1</sup>H ayuda a discriminar los tumores malignos de los benignos gracias a la diferencia existente entre sus picos de colina, por ello, se está utilizando como un método complementario en el diagnóstico de cáncer de mama (118-120).

#### 1.8.4.1. Espectroscopía testicular.

Las aplicaciones clínicas de la ERM-<sup>1</sup>H están en constante evolución. En el testículo, la ERM-<sup>1</sup>H es una nueva herramienta que comienza a ser empleada, habiendo demostrado recientemente su utilidad en el diagnóstico de las azoospermias no obstructivas, al confirmar la presencia de valores tres veces superiores de colina en el parénquima testicular normal comparado con los valores de estos pacientes infértiles (121). A diferencia de las evaluaciones actuales de fecundidad, la ERM-<sup>1</sup>H también ha demostrado ser capaz de medir directamente la actividad metabólica testicular, observando que con la llegada de la pubertad en los adolescentes existe un incremento muy evidente de los picos de colina, atribuidos al inicio de la actividad espermatogénica y una disminución de los picos lipídicos al utilizar estos metabolitos en la síntesis hormonal (122). Los últimos avances tecnológicos, incluyendo la supresión del agua y de los lípidos y su mejor resolución espacial, hacen que la ERM-<sup>1</sup>H sea una técnica que pueda proporcionar mapas metabólicos testiculares *in vivo* (123).

La figura 28 representa los metabolitos detectados en la espectroscopía testicular en nuestro estudio, encontrando de manera sistemática valores de colina, creatina y lípidos en los testículos sanos. En la figura 29, se observa como existe una drástica disminución de los valores de colina cuando existe patología en el parénquima testicular.

# INTRODUCCIÓN



Figura 28. Representación de los valores espectroscópicos encontrados en el parénquima testicular sano: colina, creatina y lípidos

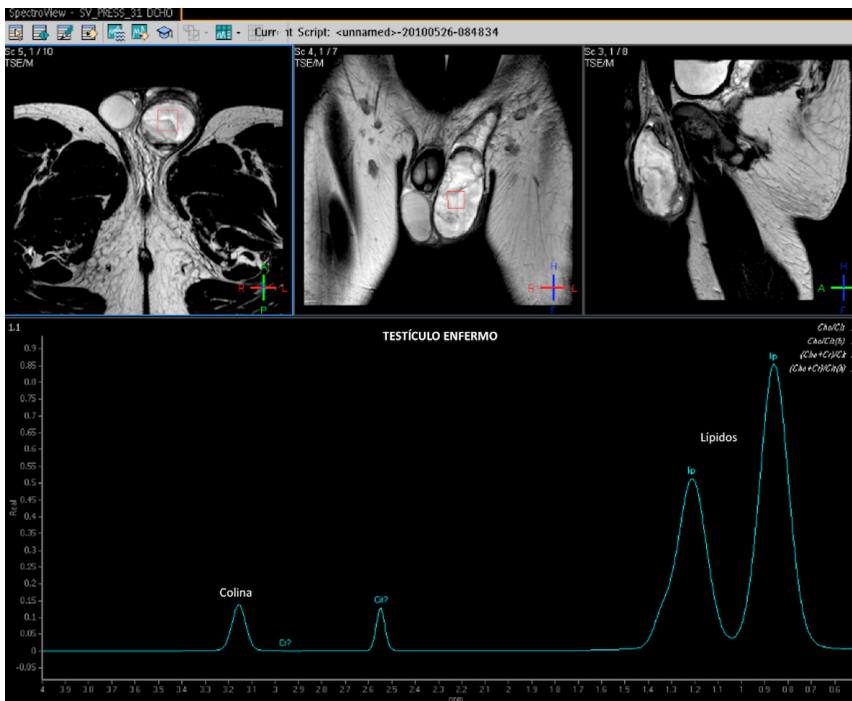


Figura 29. Disminución drástica de los valores de colina secundario a la presencia de patología testicular.

**JUSTIFICACIÓN**





## 2. JUSTIFICACIÓN

Se considera que en aproximadamente el 50% de las infertilidades la causa es de origen masculino, siendo un 30% propiamente masculina y un 20 % causas mixtas, en las cuales son responsables el hombre y la mujer.

La exploración completa y rigurosa de la infertilidad masculina es compleja y requiere un abordaje multidisciplinar. La exploración física, el espermiograma y la bioquímica del plasma seminal permiten explicar ciertas anomalías, en particular las azoospermias obstructivas. Sin embargo, el diagnóstico exacto de la causa de infertilidad es el resultado de un proceso que engloba a distintas especialidades médicas, pudiendo recurrir a numerosos exámenes complementarios más o menos complejos que condicionan la elección de un tratamiento o de una técnica de procreación médicamente asistida. Las pruebas de imagen como la ecografía y la RM son técnicas ya implementadas para evaluar el estado morfológico del aparato genital masculino e identificar múltiples causas de infertilidad. Pero, hoy en día, la ERM-<sup>1</sup>H representaría una nueva técnica que permitiría valorar posibles cambios bioquímicos en el parénquima testicular. Por todo ello, dado que la RM combinaría la capacidad de realizar un estudio morfológico mediante el uso de secuencias convencionales, junto con la valoración molecular cuantitativa que la espectroscopía permite de la espermatogénesis, esta prueba de imagen podría erigirse en un futuro como una nueva herramienta útil en el manejo de la infertilidad masculina.



**HIPÓTESIS**



### 3. HIPÓTESIS

La espectroscopía es una técnica que permite el estudio del metabolismo tisular aportando información bioquímica no invasiva de los tejidos. Esta técnica ya ha sido validada en el estudio de tumores y patologías en otras áreas anatómicas como cerebro, mama y próstata, permitiendo no sólo identificar la enfermedad, sino además, en el caso de los tumores, la caracterización tisular y la monitorización de la respuesta al tratamiento. En el parénquima testicular, los metabolitos valorados son la colina, la creatina y los lípidos. La colina es un indicador de recambio celular que en el testículo valdría para valorar la espermatogénesis, la creatina representaría el metabolismo energético celular y los lípidos reflejarían la producción hormonal. La RM con espectroscopía permite cuantificar y detectar los cambios metabólicos implicados en la espermatogénesis pudiendo diagnosticar tanto la patología testicular como la presencia de infertilidad masculina.



## **OBJETIVOS**





## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

- Demostrar el valor de la espectroscopía mediante RM en el diagnóstico y análisis de la infertilidad aportando un elemento cuantitativo de la misma.

### **4.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Establecer una curva espectroscópica “normal” de los metabolitos implicados en la espermatogénesis (colina, creatina y lípidos) a través de la cual se puedan establecer valores de referencia para su uso en el campo de la fertilidad masculina.
- Cuantificar la infertilidad mediante la combinación de valores espectroscópicos: colina, lípidos y creatina.
- Comparar el método de referencia utilizado en la valoración del volumen testicular (método de Lambert) con el método de segmentación en RM.
- Correlacionar el volumen testicular con las diferentes patologías encontradas en el testículo.
- Correlacionar el volumen testicular con los posibles valores de referencia obtenidos mediante espectroscopía.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL:

El estudio se inició en el año 2010 y se incluyeron en el mismo 27 pacientes que habían acudido a la consulta de urología con diferentes problemas de fertilidad y/o demandantes de la realización de una vasectomía.

El principal criterio de inclusión fue el consentimiento por parte del paciente de la realización de una RM testicular una vez explicada la ausencia de riesgos en la realización de la misma.

El único motivo de exclusión fue la existencia de contraindicaciones para la realización de la prueba como: marcapasos cardíacos, desfibriladores y neuroestimuladores, prótesis e implantes cocleares, clips vasculares intracraneales de material ferromagnético (dado que pueden ser movilizados dentro del campo magnético), presencia de partículas metálicas como virutas, perdigones o restos de metralla en zonas vitales (órbita, médula espinal) y la claustrofobia.

Finalmente, se estudiaron 27 pacientes, de los cuales 3 sólo tenían el testículo derecho, 1 sólo el izquierdo y 23 tenían los dos, lo que suponía un total de 50 testículos. Se obtuvo la aprobación ética para la realización del estudio por parte del centro.

### 5.2. MÉTODOS:

#### 5.2.1. Consulta a urología

En la consulta de urología se realizó una historia clínica, el IMC, el examen físico, pruebas analíticas, así como el espermiograma de todos los pacientes.

El índice de masa corporal (IMC), que se define como el cociente entre el peso (Kg.) y la talla al cuadrado (m), se dividió en 4 grupos utilizando la clasificación de la Sociedad Española para el Estudio del Sobrepeso y la Obesidad (SEEDO) (124). Además, se establecieron dos grupos de pacientes en función de su IMC considerando un punto de corte de  $25 \text{ Kg/m}^2$ . Un valor igual o superior a este se definió como sobrepeso. Se calculó este valor con el fin de establecer la relación entre la talla, peso y el volumen testicular.

Tras los resultados y el estudio mediante técnicas de imagen el urólogo estableció un diagnóstico tratando, si era necesario, la patología presentada.

### 5.2.2. Pruebas de imagen

En todos los casos se realizó una RM testicular en una máquina de 1,5 teslas (Gyrosan Intera Maestro, Philips, Best, Países Bajos) con una bobina de superficie. En la parte del examen mediante el uso de secuencias convencionales de RM, el protocolo de la prueba consistió en cortes anatómicos en los tres planos ortogonales (axiales, coronales y sagitales) con secuencias TSE potenciadas en T2 (TR / TE = 5026/125 ms., matriz = 256 × 192, grosor de corte = 4 mm, espacio intersección = 1 mm) y cortes axiales SE potenciados en T1 (TR / TE 500/12 = ms.) (Fig. 30). La inyección de contraste paramagnético (0,1mmol/Kg de peso) no se realizó de forma rutinaria, llevándose a cabo, únicamente, en algunos casos selectivos para ayudar a diferenciar lesiones quísticas benignas de neoplasias quísticas o para ayudar a determinar la afectación tumoral. Cuando se realizó exploración con contraste, se efectuaron cortes en los tres planos del espacio en secuencias GRE T1 con saturación grasa.

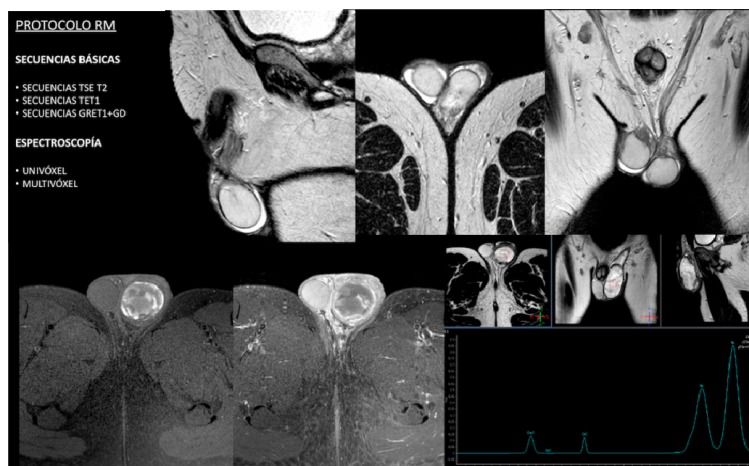


Figura 30. Protocolo de RM realizado en el estudio.

Para la realización de la espectroscopía mediante RM se utilizaron secuencias del tipo PRESS (“point resolved spectroscopy”) tanto univóxel como multivóxel con un TR de 2000 y un TE de 31 ms. (Fig. 31). En la práctica clínica habitual, se considera que cuando la región a estudiar está claramente definida sería de elección la utilización de secuencias univóxel por su mayor calidad y rapidez en cuanto a obtención y procesado de espectroscopía. El vóxel debe ser colocado lejos de los artefactos de susceptibilidad y de los lípidos.

El proceso para obtener un espectro “in vivo” se puede dividir en tres fases:

- *Posicionamiento de la bobina* en la región en la cual se quieren obtener los espectros, en este caso el parénquima testicular. Debe asegurarse que la zona a estudiar esté situada correctamente dentro del volumen de observación de la bobina mediante la obtención de una serie de imágenes rápidas, las cuales servirán posteriormente para la localización del vóxel de interés.
- *Homogenización del campo magnético en la zona de interés*. Los tejidos y los órganos de las personas presentan diferentes susceptibilidades magnéticas, lo que condiciona pequeñas variaciones locales en la intensidad del campo magnético. Cuando estos cambios se producen dentro del volumen a estudiar, un núcleo en una determinada célula presenta gran variación en sus frecuencias de resonancia, dando como resultado un espectro con unos picos muy anchos y de menor intensidad. Este problema se soluciona colocando la bobina en el centro del imán o muy cerca de él, para así obtener la mayor homogeneidad del campo magnético y, por ello, los equipos ya vienen equipados con un conjunto de bobinas que generan gradientes de campo magnético. La corriente que circula por estas bobinas varía de manera que se compensen estas heterogeneidades del campo principal.
- *Obtención del espectro*. La obtención de un espectro de un órgano determinado obliga a optimizar los parámetros de adquisición experimentalmente mediante estudios previos con pacientes voluntarios. Para diseñar un protocolo de  $^1\text{H}$ -ERM se deben tener en cuenta una serie de factores. Naturalmente, la correcta selección del núcleo de observación es básica. La sensibilidad magnética del mismo y su abundancia natural en el medio (entre otros factores) determinarán la posibilidad de detectar el metabolismo de interés. La selección de la bobina se hará en función de la región a estudiar. Tanto para su obtención como para su respectivo postproceso se debe tener en cuenta la uniformidad de las señales o excitaciones que generan. En la práctica clínica generalmente se utilizan 128 señales de promedio para obtener un espectro adecuado para su interpretación. El tipo de secuencia de pulso a utilizar es un factor importante, así como la necesidad de localizar la región a explorar teniendo en cuenta sus características y limitaciones técnicas. El tamaño del vóxel se decidirá en función del núcleo a estudiar/cuantificar, de la concentración de los metabolitos que se deseen detectar y del tamaño de la zona patológica. Las dimensiones actuales de



## MATERIAL Y MÉTODOS

los vóxel (volúmenes) son variables, desde 1x1x1 cm (1cm<sup>3</sup>) a 3x3x3 cm (27 cm<sup>3</sup>). A medida que se utilizan volúmenes más pequeños, la relación señal-ruido disminuye y es necesario obtener un promedio de señales más grande para alcanzar un espectro de adecuada calidad, el tiempo de adquisición también estará en función de dicho valor (señal-ruido).

En nuestro estudio se estableció un volumen de interés (VOI) de 1,5 cm en los tres planos, lo que suponía un volumen total de 3,375 mm<sup>3</sup>. Los VOIs fueron colocados en el centro del parénquima testicular con el fin de evitar la contaminación de las estructuras adyacentes.

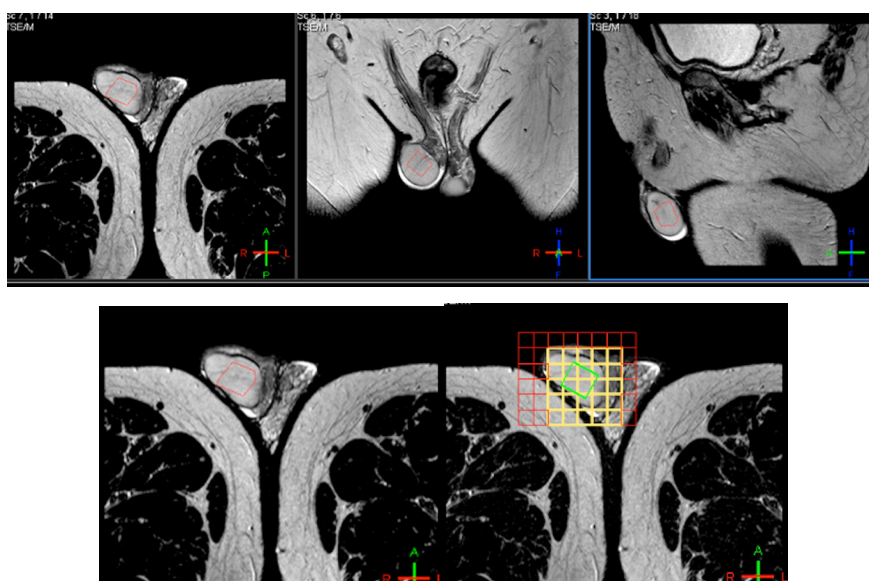


Figura 31. Representación de una secuencia espectroscópica. Adquisición univóxel (fila superior): Se coloca una única caja en el parénquima testicular en los tres planos del espacio. Adquisición multivóxel (fila inferior) que permite el estudio de todo el parénquima.

### 5.2.3. Evaluación de las imágenes

**5.2.3.1. Valoración de la espectroscopía.** El análisis de un espectro proporciona información sobre los compuestos presentes, sus niveles y su entorno. Después del procesado de la señal original, se inicia el análisis del espectro para extraer la información deseada. Los espectros son calculados de forma automática utilizando la corrección de línea de base, la corrección de fase y el ajuste de la curva. Un espectro se representa con un **eje de abscisas**, que representa la posición de los metabolitos en función de su desplazamiento químico, lo que permite identificar el compuesto que origina la señal, y **una ordenada**, que representa la amplitud de pico (Figura 30). El

área bajo cada pico es proporcional al número de núcleos que contribuyen a la señal, con lo cual, se pueden calcular las concentraciones de los metabolitos presentes. La delimitación de cada pico del espectro está influenciada por varios factores como la homogeneidad del campo magnético externo o el tiempo de relajación transversal o T2 (cuanto más prolongado es el T2, más estrecho es el pico del espectro).

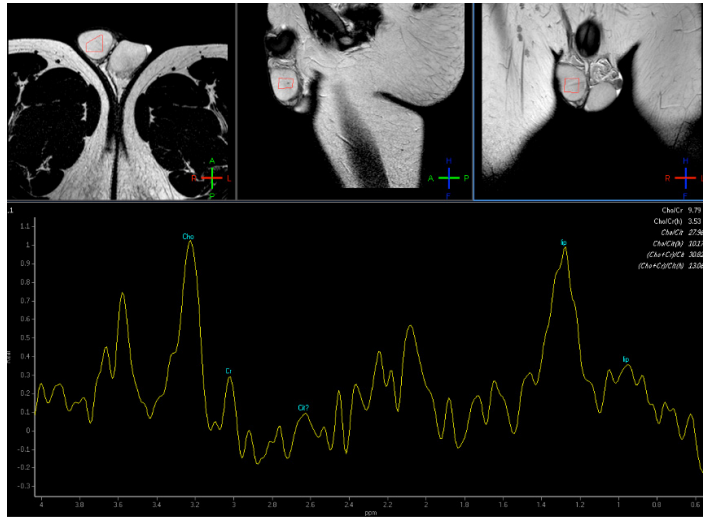


Figura 32. Representación de una curva de espectroscopía. El eje "y" permite cuantificar el pico del metabolito y el eje "x" identificarlo.

En nuestro estudio fueron identificados picos de los siguientes metabolitos (ver Figura 32):

- Colina (Co): Formado por distintas moléculas no separables (acetilcolina, glicerolfosfocolina, fosfocolina y fosfatidilcolina) involucradas en el metabolismo de las membranas celulares. El pico se encuentra situado a 3,2 ppm.
- Creatina (Cr): Compuesto por creatina, fosfocreatina y, en menor grado, por ácido  $\gamma$ -aminobutírico, lisina y glutatión. El pico aparece a 3,03 ppm. Puede existir un pico adicional a 3,94 ppm. Las concentraciones de Cr son relativamente constantes y tienden a ser resistentes a los cambios por lo que se utilizan de referencia para cocientes metabólicos (NAA/Cr, Cho/Cr etc.).
- Lípidos (LipX): Compuestos por ácidos grasos no saturados, con picos a distintos niveles: 0,8, 1,2, 1,5 y 6,0 ppm. Estas sustancias se observan sólo si se emplean TE cortos. Los lípidos de nuestro estudio son los lípidos de metileno (1,3 ppm).

### 5.2.3.2. Valoración del volumen testicular.

Para la estimación del volumen testicular se aplicaron dos métodos. El primero, **la fórmula propuesta por Lambert**, que considera que el volumen es el resultado de largo  $\times$  ancho  $\times$  alto  $\times 0,71$ .

El segundo método fue la **segmentación testicular mediante RM**. Para ello se determinó manualmente el área de los testículos en cada corte y se calculó el volumen total gracias al programa Osirix<sup>R</sup> (programa informático para la valoración de imágenes DICOM), tal y como se representa en la figuras 33 y 34. Finalmente se realizó una comparación de los resultados obtenidos con ambos métodos.

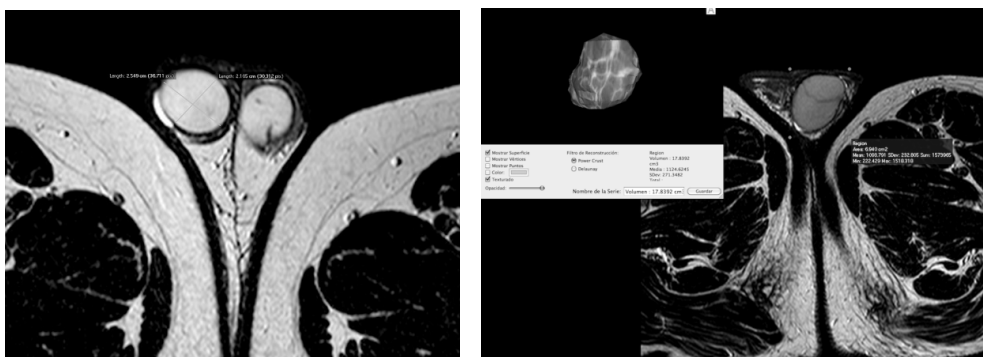


Figura 33 (izquierda): Representación de la cuantificación del volumen mediante la fórmula propuesta de Lambert. Figura 34 (derecha): Representación del volumen a través de la segmentación RM (área en cada plano para calcular un volumen total).

## 5.3. DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDAD

En nuestro estudio se consideraron pacientes infértiles a aquéllos que presentaban alguna de las causas recogidas en la guía de infertilidad de la sociedad europea de urología, entre las que se incluyen 5 grandes grupos (125):

- Alteraciones genéticas asociadas a la infertilidad.
- Alteraciones congénitas o adquiridas del tracto urogenital.
- Infecciones del tracto urogenital.
- Varicocele.
- Patología endocrina.
- Factores inmunológicos.
- Obstrucción.
- Enfermedades sistémicas.

- Idiopática.
- Otras anomalías

#### 5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La definición de todas las variables utilizadas para realizar el análisis estadístico se presenta en la Tabla 12a y 12b.

Variables del paciente	Tipo	Categorías (si procede)
Grupo de edad	Ordinal	20-39 años 40-59 años
Fumador	Dicotómica (sí-no)	
Bebedor	Dicotómica (sí-no)	
HTA	Dicotómica (sí-no)	
Diabetes	Dicotómica (sí-no)	
Categorías del IMC	Ordinal	Bajo peso (IMC<18,5) Normopeso (18,5≤IMC<25) Sobrepeso (25≤IMC<30) Obesidad (IMC≥30)
Sobrepeso (IMC≥25)	Dicotómica (sí-no)	
Motivo de consulta	Nominal	Dolor Aumento de volumen testicular Demanda de vasectomía Consulta de infertilidad Otras
Antecedentes urológicos	Nominal	Ninguno Vasectomía Orquiectomía parcial Varicocele previo Otros
Infertilidad	Dicotómica (sí-no)	
Clasificación de infertilidad	Nominal	Pretesticulares Testiculares Post-testiculares
Causas de infertilidad	Nominal	Tumor testicular Varicocele Obstrucción Otros

Tabla 12a. Definición de las variables analizadas.

Variables del testículo	Tipo	Categorías (si procede)
Antecedentes testiculares	Nominal	Ninguno Orquiectomía parcial Teste retráctil Cirugía previa de varicocele Criptorquidismo
Patología testicular en RM	Dicotómica (sí-no)	
Tipo de patología	Nominal	Tumor testicular Varicocele Dilat Rete testis Otras
Volumen testicular	Tipo	Categorías (si procede)
Método de Lambert	Continua	
Segmentación en RM	Continua	
Espectroscopía	Tipo	Categorías (si procede)
Valores espectroscópicos	Continua	

Tabla 12b. Definición de las variables analizadas

Al haber considerado cada testículo como un caso independiente se utilizaron test estadísticos específicos que ajustasen la varianza existente por pertenecer al mismo paciente (dado que las medidas de los testículos apareados tienden a estar positivamente correlacionadas). El análisis estadístico se realizó siguiendo el siguiente esquema:

#### 5.4.1. Características de los pacientes y de los testículos:

Se describieron las características de los pacientes y de los testículos incluidos en el estudio mediante tablas de frecuencias.

#### 5.4.2. Volumen testicular

##### 5.4.2.1. Descripción del volumen testicular.

Para cada método se calcularon los estadísticos descriptivos del volumen testicular (media, desviación estándar y rango) para los testículos izquierdo y derecho por separado y en conjunto. La distribución de los valores del volumen se analizó gráficamente mediante diagramas de caja.

#### 5.4.2.2. Comparación del volumen de los dos testículos.

En los pacientes con dos testículos, se calculó la diferencia de volumen medio entre ellos según cada método y un intervalo de confianza del 95%. Además, se analizó gráficamente la distribución de las diferencias de volumen testicular mediante una estimación no paramétrica de la función de densidad (126).

Por otra parte, se completó el análisis gráfico con diagramas de dispersión del volumen testicular derecho frente al izquierdo, junto con la recta del ajuste lineal y la recta diagonal para poner de manifiesto las diferencias de volumen entre los testículos del mismo paciente. También se calculó, para cada método, el coeficiente de correlación lineal de Pearson entre el volumen testicular izquierdo y el derecho, junto con un intervalo de confianza del 95%.

#### 5.4.2.3. Comparación de los métodos de estimación del volumen.

Se representó gráficamente la distribución del volumen testicular obtenido por cada método mediante la estimación no paramétrica de la función de densidad (126) y se estimó la diferencia de volumen medio entre los dos métodos con un intervalo de confianza bootstrap (127) del 95%. Este método se basa en técnicas de remuestreo y permite, por un lado, no hacer ninguna asunción sobre la distribución de los datos y, por otro, tener en cuenta la correlación que existe entre los dos valores del mismo paciente al hacer el remuestreo por paciente. En todos los casos se realizaron 1.000 réplicas y el intervalo de confianza se calculó con el método de los percentiles (127).

Para analizar la concordancia entre los dos métodos de estimación del volumen testicular se utilizó la metodología gráfica propuesta por Bland y Altman (128) que se basa en representar en un diagrama de dispersión las diferencias de volumen testicular entre los dos métodos frente a la media de los dos valores, considerada como la mejor estimación del volumen testicular. En el gráfico se incluyen tres líneas horizontales que representan la media de las diferencias y un intervalo de confianza del 95%, que, en este caso, se ha calculado con el método bootstrap (127).

Por último, se calculó el error relativo del método de segmentación en la RM frente al método de Lambert, considerado éste como referencia, y se representaron los valores del error en un diagrama de dispersión frente al volumen testicular obtenido con la fórmula de Lambert. En la gráfica se incluyó la curva del ajuste cuadrático para visualizar la tendencia del error.

### 5.4.2.4. Relación del volumen testicular con otras variables.

Para cada método se analizó la relación del volumen testicular con características del paciente (edad y grupo de edad, índice de masa corporal, sobrepeso, e infertilidad) y con características de los testículos (patología en RM).

Para las variables continuas, edad e IMC, se ajustó un modelo lineal general GEE (ecuaciones estimadas generalizadas) (129) del volumen testicular frente a cada una de ellas. Este modelo permite tener en cuenta la correlación existente entre los testículos del mismo paciente.

Para las variables cualitativas o dicotómicas se calcularon la media y desviación estándar del volumen testicular en cada grupo y estimó la diferencia de medias con un intervalo de confianza bootstrap (127) del 95%. Además, se compararon las medias de los dos grupos mediante una versión del test no paramétrico de Mann-Whitney que tiene en cuenta la correlación intrapaciente (130).

### 5.4.2.5. Curva ROC del volumen testicular.

Para cada método se analizó la capacidad del volumen testicular como marcador de patología testicular mediante una curva ROC. Las curvas ROC se utilizan para evaluar la capacidad diagnóstica de pruebas con resultado ordinal o continuo, y se obtienen al representar gráficamente los valores de 1-especificidad frente a la sensibilidad para cada categoría o punto de corte de la prueba. El área bajo la curva ROC (AUC), que toma valores entre 0 y 1, es una medida de la capacidad diagnóstica global de la prueba, que es mejor cuanto más próxima es el AUC a 1 (131,132). En este trabajo se estimó el AUC a partir de la curva ROC empírica y se calculó un intervalo de confianza del 95% teniendo en cuenta la correlación entre los datos (133).

## 5.4.3. Valores espectroscópicos.

### 5.4.3.1. Descripción de los valores espectroscópicos.

Se calcularon estadísticos descriptivos de los picos de colina, lípidos y creatina (media y desviación estándar) y se representó gráficamente la estimación no paramétrica de la función de densidad (126) de cada variable. Además, se calcularon

las razones (Colina+Creatina/Lípidos) y Colina/Lípidos y se describió gráficamente su distribución.

#### 5.4.3.2. Relación de los valores espectroscópicos con el volumen testicular.

Se analizó la relación entre los valores de colina, lípidos, creatina y el volumen testicular mediante un modelo lineal general GEE (129) de cada valor espectroscópico frente al volumen estimado por segmentación y por la fórmula de Lambert.

#### 5.4.3.3. Relación de los valores espectroscópicos con variables diagnósticas.

Se analizó la relación entre los valores de colina, lípidos, creatina y las dos razones (Colina+Creatina/Lípidos) y Colina/Lípidos y las siguientes variables diagnósticas: patología testicular en RM e infertilidad. En cada caso se calculó la media y desviación estándar de cada grupo y se estimó la diferencia de medias con un intervalo de confianza bootstrap (127) del 95%. Además, se compararon las medias de los dos grupos mediante el test de Mann-Whitney para datos correlacionados (130).

#### 5.4.3.4. Capacidad diagnóstica de los valores espectroscópicos

Para cada variable (patología testicular en RM e infertilidad) se analizó la capacidad diagnóstica de los valores espectroscópicos de la colina y la razón colina /lípidos mediante curvas ROC (131-133). Se calculó el punto de corte de la curva que cumpla el criterio de sensibilidad=especificidad.

### 5.4.4. Espermiograma

Se comparan los valores de las medias de los metabolitos colina, lípidos y creatina con la presencia de oligospermia mediante el Test de Mann-Whitney (130).

Todos los datos se han analizado mediante los paquetes estadísticos STATAv10 Y R.





## **RESULTADOS**



## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

La edad media de los pacientes era de  $38,7 \pm 11,0$  años (rango: 21 a 58 años) y casi la mitad de ellos (45,5%) tenían 40 años o más. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 13.

Todos los motivos de consulta al urólogo presentaban la misma frecuencia relativa (22,2% de pacientes), salvo la demanda de vasectomía, que fue la causa por la que consultaron 3 pacientes (11,1%), todos ellos menores de 40 años. La distribución de los motivos de consulta en los dos grupos de edad analizados puede verse en la Figura 35, donde se observa que la consulta por infertilidad fue más frecuente entre pacientes mayores de 40 años, entre los que, además, representó el principal motivo de consulta (41,7%); mientras que los jóvenes consultaron por dolor y aumento del volumen testicular (26,7% en ambos casos).

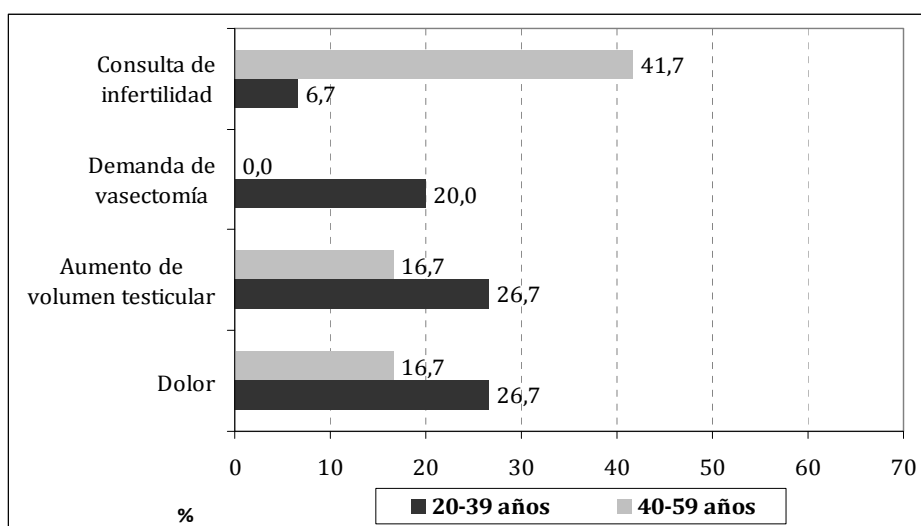


Figura 35.- Distribución del motivo de consulta al urólogo por grupo de edad.

El 52% de los pacientes no presentaban antecedentes urológicos de interés. Por grupos de edad, esta situación se dio en el 73,3% de los pacientes menores de 40 años y en el 25% de los mayores de esa edad. En relación a los factores de riesgo, un tercio de los pacientes eran fumadores y más de la mitad (56,5%) tenían un IMC igual o superior a 25 (Tabla 13).

## RESULTADOS

Variable	n	%
<b>Grupo de edad</b>		
20-39 años	15	55,5
40-59 años	12	45,5
<b>Motivo de consulta</b>		
Dolor	6	22,2
Aumento de volumen testicular	6	22,2
Demanda de vasectomía	3	11,1
Consulta de infertilidad	6	22,2
Otras	6	22,2
<b>Antecedentes urológicos</b>		
Ninguno	14	51,9
Vasectomía	1	3,7
Orquiectomía parcial	2	7,4
Varicocele previo	3	11,1
Otros	7	25,9
<b>Factores de riesgo</b>		
Fumador	9	33,3
Bebedor	3	11,1
HTA	2	7,4
Diabetes	2	7,4
<b>Categorías de IMC</b>		
Bajo peso (IMC<18,5)	1	4,4
Normopeso (18,5≤IMC<25)	9	39,1
Sobrepeso (25≤IMC<30)	9	39,1
Obesidad (IMC≥30)	4	17,4
<b>Infertilidad</b>	21	77,7
<b>Clasificación de infertilidad</b>		
Pretesticulares	1	3,7
Testiculares	15	55,5
Post-testiculares	5	18,5
<b>Infertilidad y causas</b>		
Tumor	7	25,9
Varicocele	3	11,1
Obstrucciones	3	11,1
Infecciones (orquiepididimitis)	2	7,4
Disfunción eréctil	2	7,4
Criptorquidismo	1	3,7
Hipogonadismo	1	3,7
Trauma	1	3,7
Hernia inguino-escrotal	1	3,7

Tabla 13.- Características de los pacientes.

Como se observa en la Tabla 13, más de la mitad de los pacientes presentaban infertilidad (77,7%) fundamentalmente debida a causas testiculares. De los 21

pacientes con infertilidad, 11 tenían menos de 40 años, lo que suponía un 60% de los pacientes de esta edad, frente a un 75% en el grupo de 40 a 64 años. En cuanto a la distribución de las causas por grupos de edad, cabe destacar que en los pacientes más jóvenes todas las causas fueron testiculares, mientras que en los pacientes de mayor edad predominaron las causas post-testiculares (Tabla 14). En la tabla se puede observar, además, que los varicoceles se encontraron solamente en el grupo de 20 a 39 años. Los tumores presentaban respectivamente una frecuencia del 36,3% entre los pacientes de 20 a 39 años y del 25% en los pacientes mayores de 40, siendo su diagnóstico un hallazgo incidental.

Clasificación de infertilidad	20-39 años		40-59 años	
	n	%	n	%
Pretesticulares	0	0,0	1	9
Testiculares	10	100,0	5	45,45
Post-testiculares	0	0,0	5	45,45
<b>Infertilidad y causas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Tumor testicular	4	36,3	3	25%
Varicocele	3	27,3	0	0,0
Otros	4	36,3	7	75%

Tabla 14.- Distribución, por grupos de edad, de la clasificación de la infertilidad y sus diferentes causas.

En cuanto a la relación entre el motivo de consulta y la infertilidad, todos los pacientes que acudieron al urólogo por una consulta propiamente de infertilidad tuvieron un diagnóstico de infertilidad (100% de los casos) (Tabla 15). Se observa también que los pacientes infértiles presentaban en un 92,3% de los casos antecedentes urológicos.

	Nº de pacientes	Infértiles n (%)
<b>Motivo de consulta</b>		
Dolor	6	6 (100)
Aumento del volumen testicular	6	5 (83,3)
Demanda de vasectomía	3	0 (0,0)
Consulta de infertilidad	6	6 (100,0)
Otras	6	4 (66,6)
<b>Antecedentes urológicos</b>		
No	15	9 (60)
Si	13	12 (92,3)

Tabla 15.- Porcentaje de infertilidad según motivo de consulta y antecedentes urológicos.

## 6.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS TESTÍCULOS

Se han estudiado un total de 50 testículos, de los cuales 26 son izquierdos y 24 derechos. Un 36% (n=18) de los testículos mostraron patología en el estudio de resonancia magnética. Las características de los testículos se muestran en la Tabla 16.

Variable	n	%
<b>Antecedentes testiculares</b>	6	12,0
Orquiectomía parcial	2	33,3
Teste retráctil	1	16,7
Cirugía previa de varicocele	1	16,7
Criptorquidismo	2	33,3
<b>Patología testicular en RM</b>	18	36,0
Tumores	3	16,7
Varicocele	6	33,3
Otros	7	38,9
Dilatación Rete testis	2	11,1

Tabla 16.- Características de los testículos.

Entre los pacientes con los dos testículos (n=23), había 5 que presentaban hallazgos patológicos en RM en ambos testículos, 6 tan solo tenían uno de ellos afectado (2 derechos y 4 izquierdos) y los 12 restantes tenían los dos testículos sanos. En relación a la patología testicular, sólo 3 testículos presentaban tumores primarios testiculares (2 seminomas y un tumor involucionado espontáneamente a tejido fibroso o tumor "quemado"). Este dato podría parecer discrepante con los valores de la Tabla 13, en donde se habla de 7 pacientes con patología tumoral. Sin embargo, los otros 4 pacientes presentaban, todos ellos, hallazgos normales en el estudio de RM testicular pero tenían una historia oncológica previa: enfermedad metastásica de un seminoma, melanoma metastático con afectación del testículo (que se había extirpado), paciente con coriocarcinoma testicular en tratamiento quimioterápico y control de un tumor de Leydig.

### 6.3. VOLUMEN TESTICULAR

#### 6.3.1. Descripción del volumen testicular

En la valoración del volumen testicular se incluyeron únicamente 49 testículos dado que se excluyó el testículo izquierdo de un paciente que había sufrido un traumatismo testicular severo y no resultaba factible la realización del cálculo de su volumen al estar el teste fragmentado.

El volumen testicular medio de los 49 testículos se calculó usando tanto el método de segmentación en resonancia magnética como la fórmula de Lambert. Los resultados mostraron un volumen medio de  $18,1 \pm 7,6 \text{ cm}^3$  con el método de segmentación en resonancia magnética y de  $25,3 \pm 9,2 \text{ cm}^3$  usando la fórmula de Lambert. Además, se evidenció una diferencia de  $2 \text{ cm}^3$  entre los testículos izquierdo y derecho con el primer método y de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$  al usar el segundo método (Tabla 17).

Segmentación	n	Media (cm <sup>3</sup> )	DE	Mínimo	Máximo
Derecho	26	19,1	8,8	5,3	42,6
Izquierdo	23	17,0	5,9	4,4	28,3
Ambos	49	18,1	7,6	4,4	42,6
Fórmula de Lambert	n	Media(cm <sup>3</sup> )	DE	Mínimo	Máximo
Derecho	26	25,9	9,6	15,1	51,8
Izquierdo	23	24,7	8,8	9,6	47,4
Ambos	49	25,3	9,2	9,6	51,8

Tabla 17.- Estadísticos descriptivos del volumen testicular (derecho, izquierdo y ambos) estimado con los dos métodos. DE: desviación estándar y rango.

En la Figura 36, que muestra la distribución del volumen testicular estimado con los dos métodos, se aprecia claramente que la fórmula de Lambert realiza una estimación mayor del volumen si se compara con el de segmentación en RM y tiene mayor variabilidad.



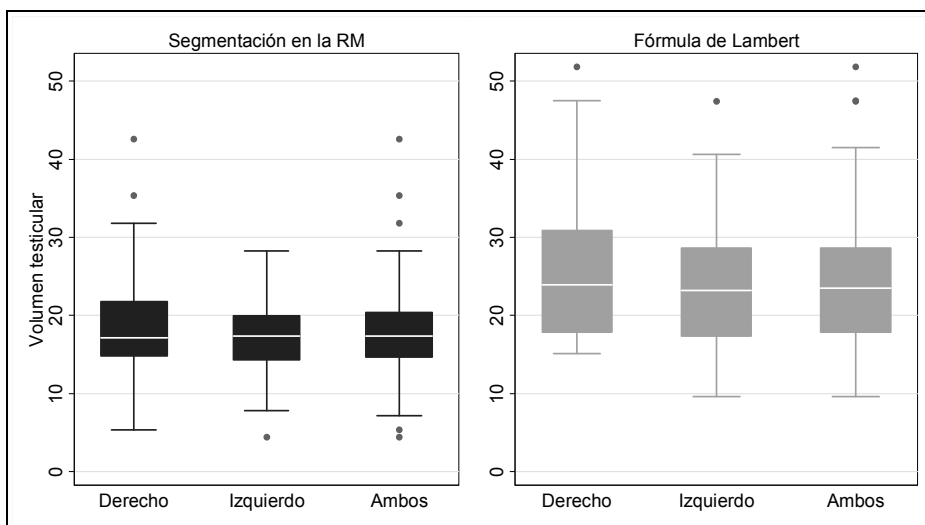


Figura 36.- Distribución del volumen testicular (derecho, izquierdo y ambos) estimado con ambos métodos.

### 6.3.2. Comparación del volumen de los dos testículos

Para este análisis, se utilizaron los datos de los 22 pacientes que tenían los 2 testículos. La diferencia media de volumen entre el testículo derecho y el izquierdo fue de  $1,7 \text{ cm}^3$  [IC95% (-0,5; 4,2)] con el método de segmentación y  $0,8 \text{ cm}^3$  [IC95% (-1,8; 4,0)] con la fórmula de Lambert. En ambos casos, no había diferencias significativas entre el volumen de los dos testículos del mismo paciente (aunque la variabilidad de las diferencias fue grande), como puede observarse en la Figura 37, que representa la distribución de las diferencias entre el volumen del testículo derecho y el del izquierdo estimado con los dos métodos.

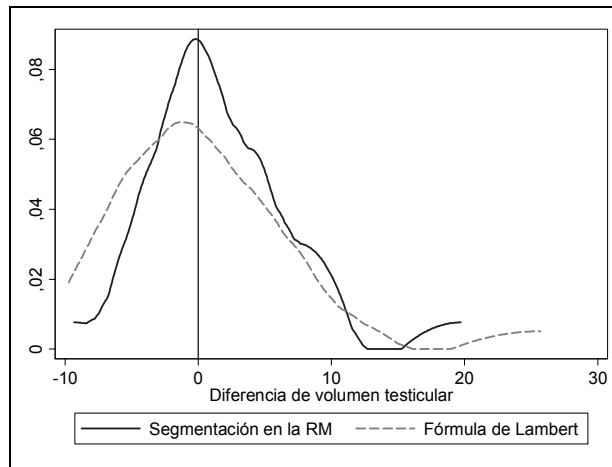


Figura 37.- Distribución de la diferencia de volumen entre el testículo derecho y el izquierdo según el método de estimación.

La Figura 38 representa, para cada método, el volumen del testículo derecho frente al izquierdo en un diagrama de dispersión, así como las rectas de ajuste lineal ( $y=a+bx$ ) y diagonal ( $y=x$ ), indicando esta última la igualdad de volumen entre los dos testículos. Atendiendo a esta figura y al coeficiente de correlación lineal de Pearson obtenido con ambos métodos (con valores de  $r=0,752$  (0,613 ; 0,891) con el método de segmentación y  $r=0,680$  (0,399 ; 0,962) con la fórmula de Lambert) puede decirse que los dos volúmenes son diferentes pero están correlacionados.

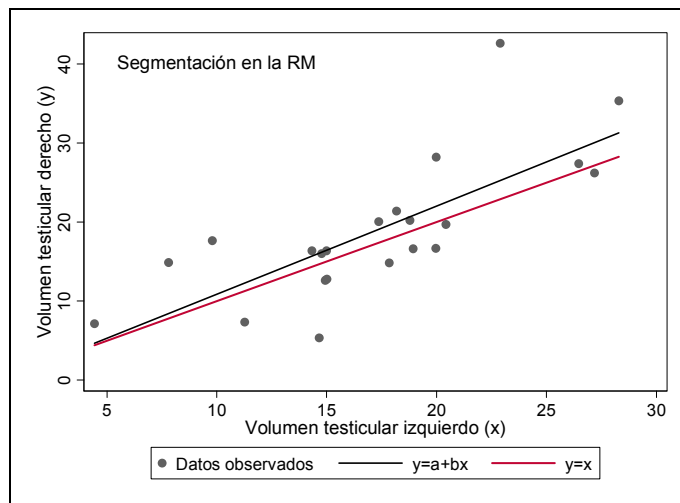


Figura 38a.- Diagrama de dispersión del volumen testicular derecho frente al volumen testicular izquierdo estimado con el método de segmentación y recta de regresión ajustada.

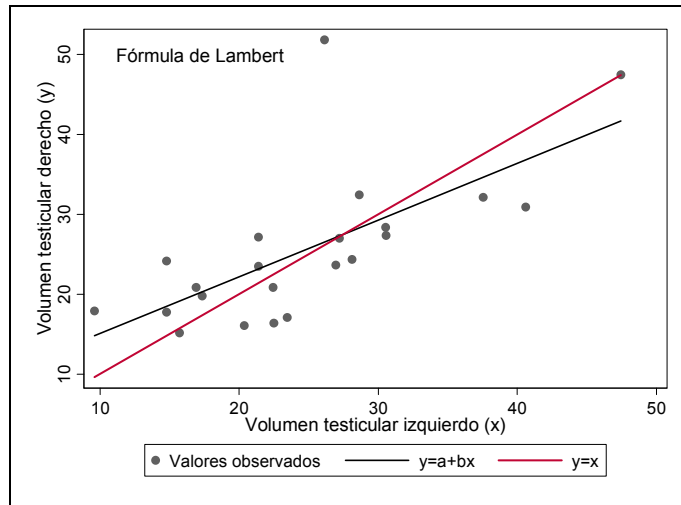


Figura 38b.- Diagrama de dispersión del volumen testicular derecho frente al volumen testicular izquierdo estimado con la fórmula de Lambert y recta de regresión ajustada.

### 6.3.3. Comparación de los métodos de estimación del volumen

La Figura 39 representa la distribución del volumen testicular según el método de estimación. Como se puede observar, y ya se comentó en el epígrafe 6.2.1, la fórmula de Lambert proporciona valores más altos y, a la vez, muestra una mayor variabilidad. La media de las diferencias entre las estimaciones de los dos métodos (Lambert-segmentación) fue de  $7,2 \text{ cm}^3$  [IC95% (5,9; 8,7)].

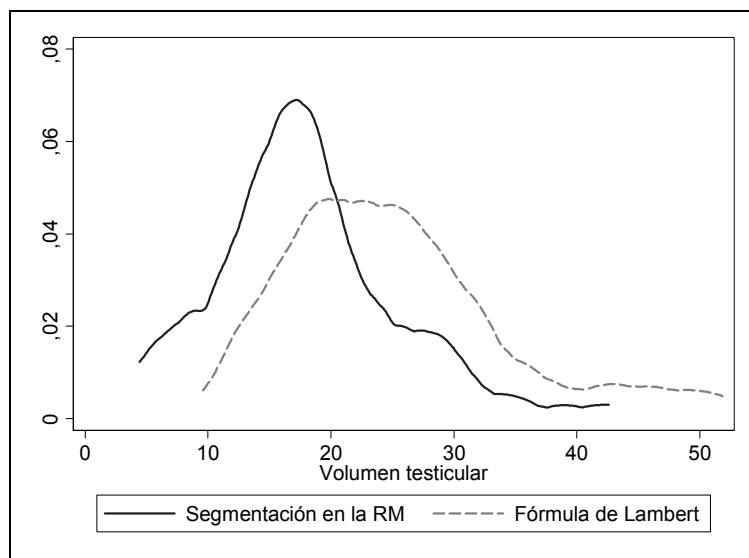


Figura 39.- Distribución del volumen testicular estimado con los dos métodos.

A pesar de que la correlación entre los dos métodos para estimar el volumen testicular es alta, como indica el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r=0,866$  ( $0,757; 0,931$ )), el análisis gráfico de la concordancia mediante el método de Bland y Altman pone de manifiesto que no producen los mismos resultados y que la diferencia tiende a ser mayor en los testículos con volúmenes más elevados (Figura 40).

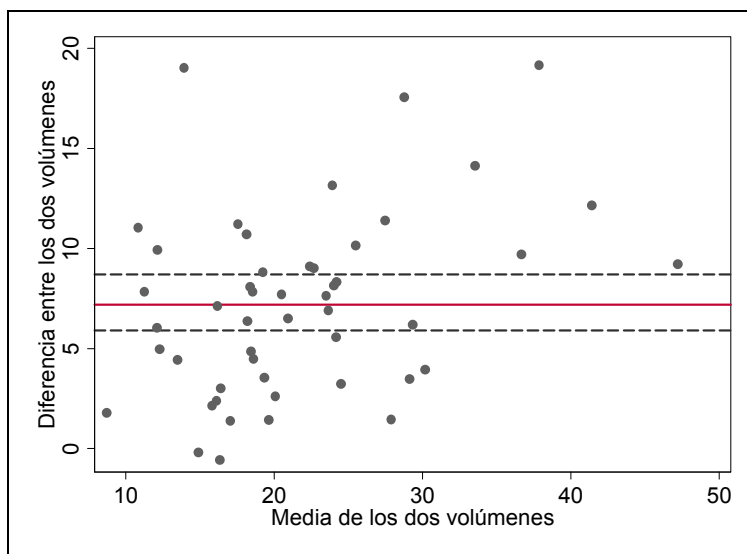


Figura 40. Análisis gráfico de la concordancia entre los dos métodos de estimación del volumen testicular.

Por otra parte, si se considera el método de Lambert como método de referencia para estimar el volumen testicular puede analizarse el error relativo del método de segmentación con respecto al estándar. Al representar en un diagrama de dispersión los valores del error relativo frente al volumen testicular estándar (Lambert) se observa una mayor dispersión de los valores del error en los testículos pequeños (Figura 41).

## RESULTADOS

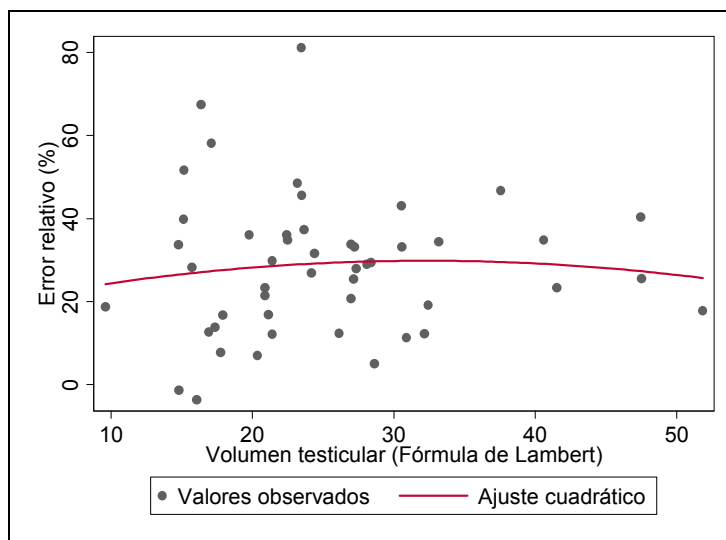


Figura 41. Error relativo del método de segmentación con respecto al método de Lambert para estimar el volumen testicular.

### 6.3.4. Relación del volumen testicular con otras variables

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las características de los pacientes (edad e IMC) y el volumen testicular estimado por cualquiera de los dos métodos, como se observa en la Tabla 18, donde se presentan los coeficientes de la regresión (modelo GEE).

Segmentación	Coefficiente	IC95%	Valor p (GEE)
Edad	0,13	(-0,15 ; 0,41)	0,368
IMC	-0,18	(-0,86 ; 0,51)	0,613
F. Lambert	Coefficiente	IC95%	Valor p (GEE)
Edad	0,26	(-0,08 ; 0,60)	0,131
IMC	-0,31	(-0,90 ; 0,29)	0,310

Tabla 18.- Coeficientes del modelo de regresión GEE entre el volumen testicular, por los dos métodos, y la edad y el IMC, con su intervalo de confianza del 95%.

Por otra parte, la diferencia de volumen medio entre jóvenes (<40 años) y adultos (40 años y más) no fue estadísticamente significativa, al igual que la diferencia de medias entre pacientes con y sin sobrepeso.

Por último, la presencia de infertilidad no mostró una relación estadísticamente significativa con el volumen testicular (Tabla 19), aunque sí se

observan diferencias en la distribución del volumen según la clasificación de la infertilidad tal y como se muestra en la figura 42; siendo respectivamente las medias para las causas pretesticulares de 9,3 cm<sup>3</sup>, testiculares de 17,8 cm<sup>3</sup> y post-testiculares de 24,38 cm<sup>3</sup> según el método de segmentación y de 15,4 cm<sup>3</sup> para las causas pretesticulares, de 23,9 cm<sup>3</sup> para las testiculares y de 35,3 cm<sup>3</sup> en las post-testiculares según el método de Lambert.

Segmentación	n	Media (cm <sup>3</sup> )	DE	Dif (IC95%)	Valor p
< 40 años	28	<b>17,4</b>	7,1		
40 años y más	21	<b>19,0</b>	8,2	1,6 (-4,1 ; 7,2)	0,06
No sobrepeso	19	<b>19,4</b>	8,3		
Sobrepeso	23	<b>16,8</b>	6,4	2,7 (-3,8 ; 7,7)	0,44
Fértil	12	<b>20,0</b>	3,7		
Infértil	37	<b>17,5</b>	8,4	-2,5 (-7,1 ; 1,8)	0,173
Fórmula de Lambert	n	Media (cm <sup>3</sup> )	DE	Dif (IC95%)	Valor p
< 40 años	28	<b>23,1</b>	7,5		
40 años y más	21	<b>28,3</b>	10,6	5,1 (-1,3 ; 12,1)	0,009
No sobrepeso	19	<b>26,1</b>	8,6		
Sobrepeso	23	<b>24,6</b>	7,8	1,5 (-4,5 ; 7,4)	0,435
Fértil	12	<b>25,6</b>	5,2		
Infértil	37	<b>25,3</b>	10,2	-0,3 (-5,6 ; 5,9)	0,398

Tabla 19.- Volumen testicular, por los dos métodos, en función del grupo de edad, el sobrepeso, y la infertilidad del paciente. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y valor p calculado con Mann-Whitney para datos correlacionados.

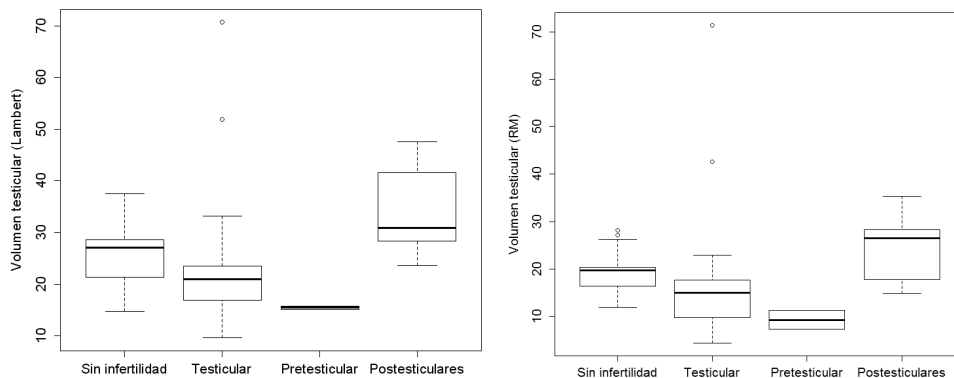


Figura 42. Distribución del volumen testicular, con ambos métodos según la clasificación de la infertilidad.

## RESULTADOS

Por otra parte, los testículos que mostraron alguna patología en la RM (y, por lo tanto, considerados como enfermos) tenían un volumen más pequeño que los testículos sanos, tanto con el método de segmentación como con la fórmula de Lambert (ver Figura 43) y la diferencia fue significativa. En relación a las patologías encontradas en los pacientes infértiles, se observa que los pacientes con tumores testiculares y los varicoceles presentan un volumen testicular medio y una desviación estándar de 17,5 cm<sup>3</sup> (10,6) y 11,7 (4,8), respectivamente según el método de RM.

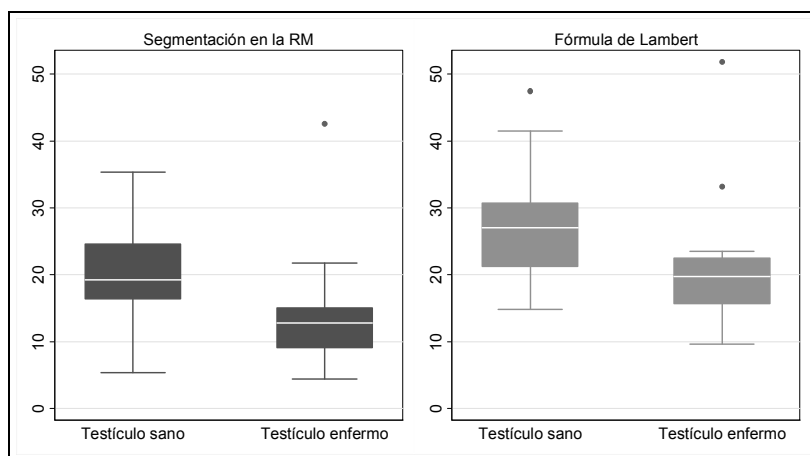


Figura 43.- Volumen testicular, por los dos métodos, en función de la presencia de patología en RM.

Segmentación	n	Media (cm <sup>3</sup> )	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano (RM)	32	<b>20,2</b>	6,2		
Testículo enfermo (RM)	17	<b>14,2</b>	8,6	6,0 (0,5 ; 10,6)	0,005
Fórmula de Lambert	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano (RM)	32	<b>27,5</b>	8,4		
Testículo enfermo (RM)	17	<b>21,2</b>	9,5	6,3 (-0,3 ; 12,3)	0,018

Tabla 20.- Volumen testicular, por los dos métodos, en función de la presencia de patología testicular en RM. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y valor p calculado con Mann-Whitney para datos correlacionados.

### 6.3.5. Curva ROC del volumen testicular como marcador de patología testicular

Al obtener diferencias estadísticamente significativas entre el volumen testicular y la presencia de patología en RM, se puede calcular la capacidad de discriminación del volumen testicular entre testículo enfermo y sano como se muestra en los siguientes resultados.

Variable	AUC	Intervalo confianza (95%)	Valor de corte	Sensibilidad=Especificidad
Volumen testicular RM	0,764	(0,595; 0,933)	16,4	0,722
Volumen testicular Lambert	0,724	(0,535; 0,912)	22,5	0,719

Tabla 21.- Volumen testicular, por los dos métodos, en función de la presencia de patología testicular en RM. Área bajo la curva, intervalo de confianza y valores de corte.

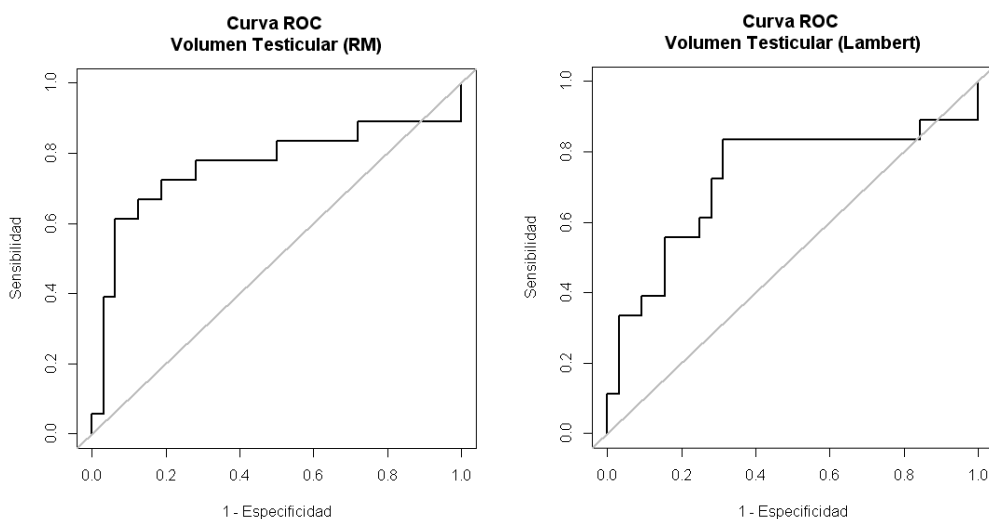


Figura 44. Curva ROC para el método de segmentación y fórmula de Lambert.



## 6.4. ESPECTROSCOPIA

### 6.4.1. Descripción de colina, creatina y lípidos

Se obtuvieron los valores de colina y lípidos de un total de 48 testículos, dado que del análisis se excluyeron los 2 testículos de un paciente que presentaba una curva espectroscópica no valorable por ser portador de una prótesis penénea y, por otra parte, se pudieron calcular los valores de creatina de tan sólo 45 testículos.

En la Figura 45 se presenta la distribución de los valores de colina, lípidos y creatina de todos los testículos que tenían una media y desviación estándar, respectivamente, de 0,91 (0,62), 1,47 (1,42) y 0,40 (0,27). Los valores mínimo y máximo eran 0,06-2,34 para la colina, 0,37-9,45 para los lípidos y 0,02-1,26 para la creatina. En la Figura 46 se muestra la distribución de las razones colina+creatina/lípidos y colina/lípidos; la primera razón tenía una media de 1,23, una desviación estándar de 0,65, y un rango de 0,08-3,00, mientras que para la segunda estos valores eran 0,81, 0,50 y 0,01-2,09.

Los estadísticos descriptivos de los valores espectroscópicos en función de las características de los pacientes (grupo de edad, sobrepeso, infertilidad y su clasificación) se muestran en la Tabla 22.

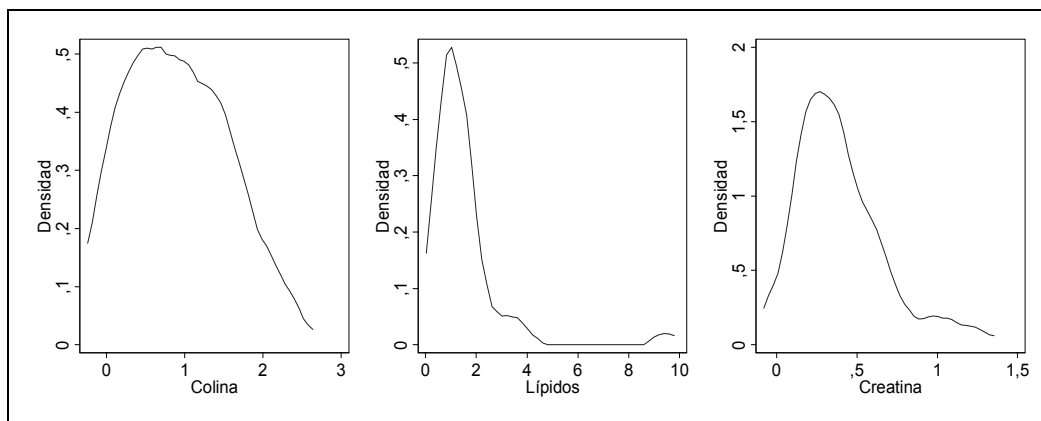


Figura 45.- Distribución de los valores de la curva de espectroscopía: colina, lípidos, creatina.

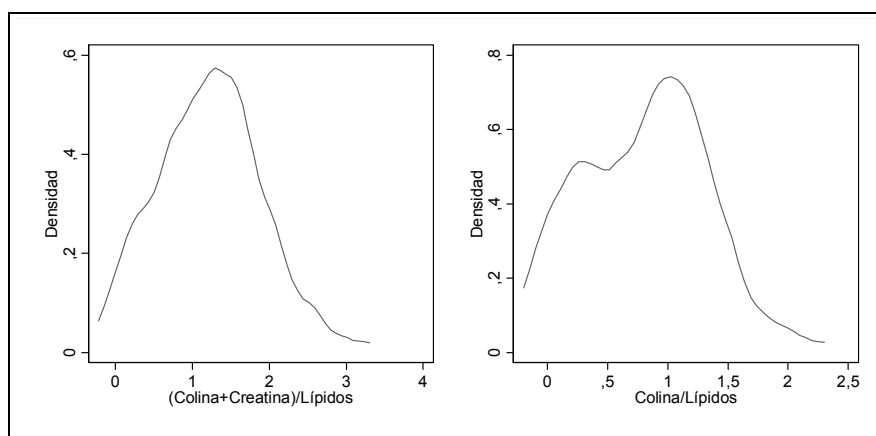


Figura 46.- Distribución de las razones colina+creatina/lípidos y colina/lípidos

Segmentación	COLINA			LÍPIDOS			CREATINA		
	n	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE
Global	48	<b>0,91</b>	0,62	48	<b>1,5</b>	1,4	45	<b>0,40</b>	0,27
< 40 años	29	<b>0,87</b>	0,60	29	<b>1,33</b>	0,81	28	<b>0,41</b>	0,32
40 años y más	19	<b>0,96</b>	0,67	19	<b>1,68</b>	2,04	17	<b>0,37</b>	0,16
No sobrepeso	20	<b>0,87</b>	0,68	20	<b>1,16</b>	0,57	20	<b>0,45</b>	0,29
Sobrepeso	21	<b>0,91</b>	0,62	21	<b>1,79</b>	1,95	19	<b>0,36</b>	0,28
Infertilidad(No)	12	<b>1,31</b>	0,47	12	<b>1,42</b>	0,63	12	<b>0,34</b>	0,16
Infertilidad (Si)	36	<b>0,77</b>	0,61	12	<b>1,49</b>	1,6	33	<b>0,41</b>	0,30
Causas de Infertilidad									
Tumores	12	<b>0,40</b>	0,26	12	<b>2,45</b>	2,77	9	<b>0,46</b>	0,22
Varicoceles	6	<b>0,65</b>	0,37	6	<b>0,86</b>	0,43	6	<b>0,47</b>	0,50
Clasifica. Infertilidad									
Pretesticulares	2	<b>0,09</b>	0,01	2	<b>0,42</b>	0,07	2	<b>0,12</b>	0,00
Testiculares	25	<b>0,60</b>	0,54	25	<b>1,78</b>	1,98	23	<b>0,49</b>	0,36
Pos-testiculares	9	<b>1,16</b>	0,41	9	<b>1,13</b>	0,37	9	<b>0,36</b>	0,10

Tabla 22.- Estadísticos descriptivos de los picos de colina, lípidos y creatina en función de las características de los pacientes. DE: desviación estándar.

### 6.4.2. Relación de los valores espectroscópicos con el volumen testicular

Se analizó la relación entre los valores de los metabolitos obtenidos en espectroscopía y el volumen testicular (obtenido en ambos métodos), mediante un modelo de regresión lineal, sólo se encuentra una relación estadísticamente significativa entre los niveles de colina y el volumen testicular calculado por segmentación, como se muestra en la Tabla 23.

## RESULTADOS

Segmentación	Coefficiente	IC95%	Valor p (GEE)
Colina	0,043	(0,022 ; 0,063)	<0,001
Lípidos	-0,017	(-0,066 ; 0,032)	0,484
Creatina	-0,001	(-0,011 ; 0,009)	0,880
F. Lambert	Coefficiente	IC95%	Valor p (GEE)
Colina	0,017	(-0,007 ; 0,041)	0,158
Lípidos	-0,01	(-0,041 ; 0,021)	0,524
Creatina	0,001	(-0,006 ; 0,008)	0,077

Tabla 23.- Coeficientes del modelo de regresión GEE entre los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía y el volumen testicular, por los dos métodos, con su intervalo de confianza del 95% y la significación (valor p).

### 6.4.3. Relación de los valores espectroscópicos con otras variables.

#### 6.4.3.1. Patología testicular en RM

En la Figura 47 se representa la distribución de los valores de colina, lípidos, y creatina y las razones (colina+creatina)/lípidos y colina/lípidos en los testículos clasificados como sanos o enfermos según la presencia de patología testicular en las secuencias convencionales de RM. En la Tabla 24 se muestran los estadísticos descriptivos, la diferencia de medias entre testículos sanos y enfermos con un intervalo de confianza Bootstrap del 95% y los respectivos valores p calculados con el test de Mann-Whitney para datos correlacionados de los valores de colina, lípidos y creatina, así como las razones: (colina+creatina)/lípidos y colina/lípidos en los testículos clasificados como sanos o enfermos según la presencia de patología en las secuencias convencionales de RM.

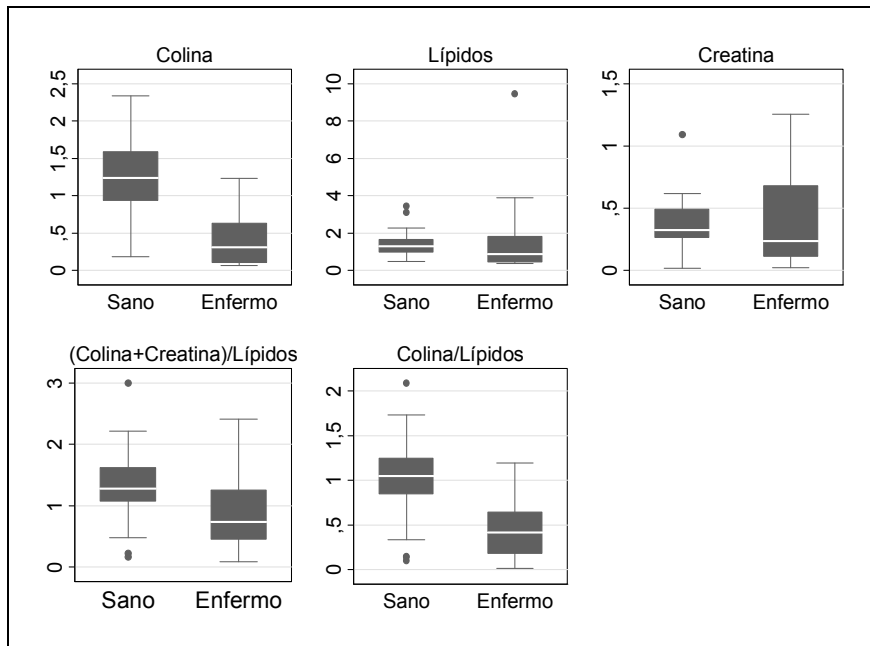


Figura 47.- Distribución de los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía en función de la presencia de patología testicular en RM.

Colina	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano	30	<b>1,22</b>	0,55	0,82 (0,56 ; 1,08)	<0,001
Testículo enfermo	18	<b>0,39</b>	0,33		
Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano	30	<b>1,38</b>	0,68	-0,23 (-1,45 ; 0,49)	0,161
Testículo enfermo	18	<b>1,62</b>	2,18		
Creatina	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano	30	<b>0,38</b>	0,19	-0,06 (-0,22 ; 0,10)	0,667
Testículo enfermo	15	<b>0,44</b>	0,39		
(Colina+Cr)/Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano	30	<b>1,34</b>	0,58	0,35 (0,00 ; 0,77)	0,048
Testículo enfermo	15	<b>0,99</b>	0,72		
Colina/Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Testículo sano	30	<b>1,02</b>	0,46	0,57 (0,32 ; 0,82)	0,001
Testículo enfermo	18	<b>0,45</b>	0,36		

Tabla 24.- Valores de los metabolitos en función de la presencia de patología testicular en RM. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y p (U de Mann-Whitney para datos correlacionados).

## RESULTADOS

Del análisis de los datos se desprende que los testículos sanos mostraban valores medios de colina más altos que los testículos enfermos con una diferencia estadísticamente significativa de 0,82 (0,56; 1,08) con el análisis de Bootstrap y de 0,001 con Mann-Whitney para datos correlacionados. Así mismo los ratios (colina+creatina)/lípidos y colina/lípidos presentan también diferencias significativas de 0,35 (0,00; 0,77) y 0,57 (0,32; 0,82), respectivamente, con el análisis de Bootstrap y de 0,048 y 0,001 con la U de Mann-Whitney para datos correlacionados.

Por el contrario, los valores de creatina y lípidos no mostraron diferencias significativas entre testículos sanos y enfermos (Tabla 24).

### **6.4.3.2. Infertilidad**

La colina fue el único valor de la curva de espectroscopía con una media significativamente mayor en los testículos de los pacientes con infertilidad, con una diferencia de medias de 0,54 (0,13; 0,84) y una  $p=0,046$  (Tabla 25). En las medias de los picos de creatina y lípidos, así como en las razones (colina+creatina)/lípidos y colina/lípidos no existieron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes fértiles e infértiles. La distribución de estos valores, en uno y otro grupo, se muestra en la Figura 48.

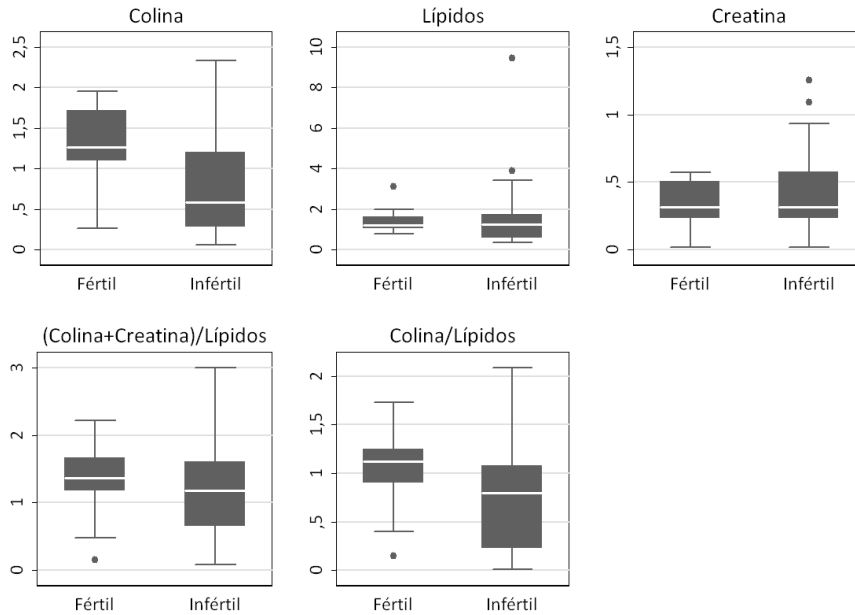


Figura 48.- Distribución de los valores de los metabolitos detectados en espectroscopía en función del diagnóstico fértil-infértil

Colina	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Fértil	12	<b>1,31</b>	0,47	0,54 (0,13 ; 0,84)	0,046
Infértil	36	<b>0,77</b>	0,61		
Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Fértil	12	<b>1,42</b>	0,63	-0,07 (-0,23 ; 0,06)	0,487
Infértil	36	<b>1,48</b>	1,61		
Creatina	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Fértil	12	<b>0,34</b>	0,16	-0,06 (-0,93 ; 0,64)	0,730
Infértil	33	<b>0,42</b>	0,30		
(Colina+Cr)/Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Fértil	12	<b>1,32</b>	0,56	0,12 (-0,37 ; 0,56)	0,281
Infértil	33	<b>1,19</b>	0,68		
Colina/Lípidos	n	Media	DE	Dif (IC95%)	Valor p
Fértil	12	<b>1,04</b>	0,43	0,31 (-0,09 ; 0,62)	0,098
Infértil	36	<b>0,73</b>	0,51		

Tabla 25.- Valores de los metabolitos en función de la presencia de infertilidad. DE: desviación estándar, Dif.: diferencia de medias, IC: Intervalo de confianza (Bootstrap) y p (U de Mann-Whitney para datos correlacionados).

### 6.4.4. Capacidad diagnóstica de los valores espectroscópicos

#### 6.4.4.1. Patología testicular en RM

Los resultados del apartado 6.4.2.1 indicarían que los posibles marcadores de patología testicular serían la colina y la razón colina/lípidos. Para el caso de los lípidos, la creatina y la razón (colina+creatina)/lípidos no se encontraron evidencias que sugiriesen que estas variables permitan “discriminar” entre testículos enfermos y sanos según la patología detectada en RM. La Tabla 26 muestra los valores del área bajo la curva (AUC) de colina y de colina/lípidos; que en ambos casos puede considerarse alta, aunque es mayor para la colina. Las figuras 49 y 50 representan las respectivas curvas ROC.

Variable	n	AUC	Intervalo confianza (95%)	Valor de corte	Sensibilidad=Especificidad
Colina	48	<b>0,903</b>	(0,817 ; 0,989)	0,651	0,80
Colina/Lípidos	48	<b>0,833</b>	(0,712 ; 0,955)	0,795	0,80

Tabla 26.- Área bajo la curva ROC (AUC) e intervalo de confianza del 95% teniendo en cuenta la presencia de datos correlacionados para la colina y la razón colina/lípidos como marcador de patología testicular en RM.

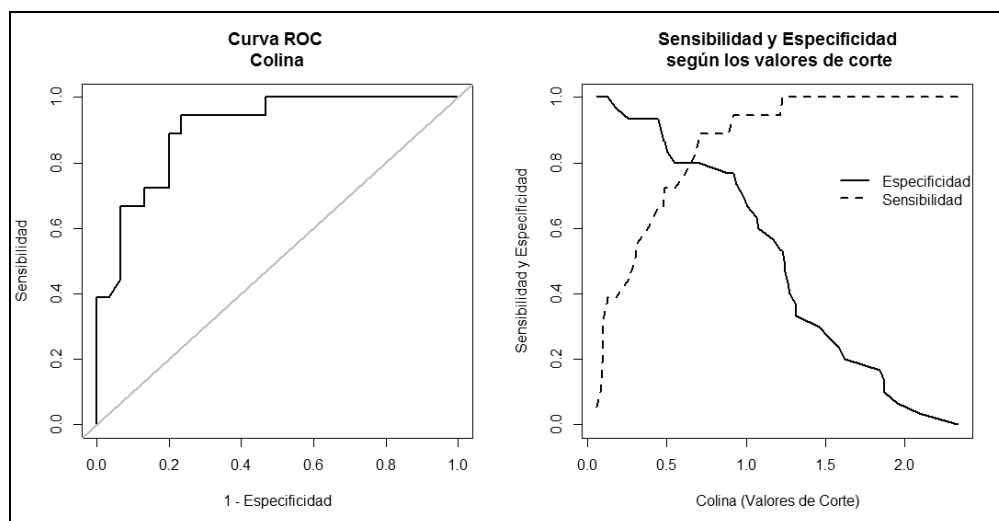


Figura 49.-Curva ROC empírica de colina como marcador de patología testicular en RM, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte.

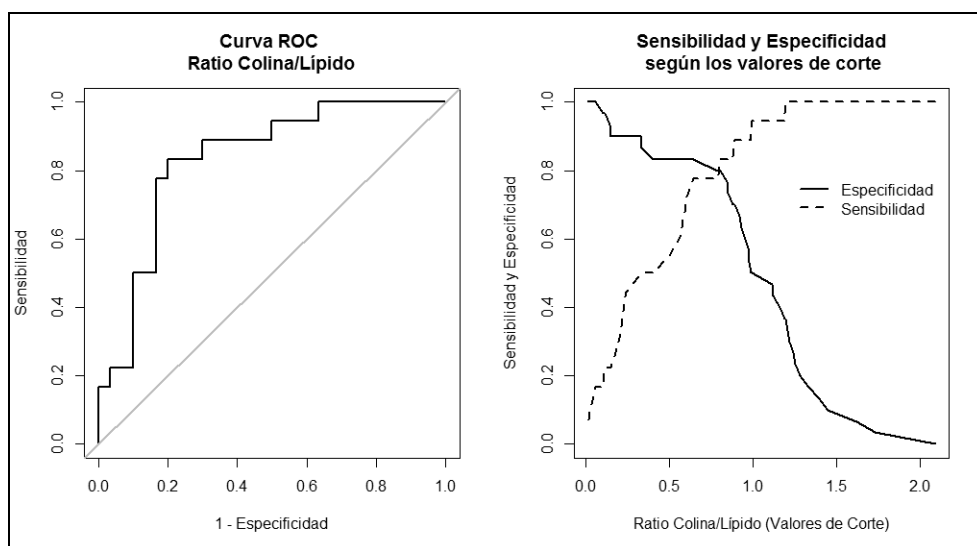


Figura 50.-Curva ROC empírica de la razón colina/lípidos como marcador de patología testicular en RM, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte.

#### 6.4.4.2. Infertilidad

En relación con el diagnóstico de infertilidad se encontró de nuevo que la colina y la razón colina/lípidos podían ser posibles marcadores de infertilidad, como se muestra en la Tabla 27 y figuras 51-52. El área bajo la curva ROC vuelve a ser mejor para la colina, aunque en los dos casos es inferior a 0,8. Tanto para los lípidos como para la creatina, no se encontraron evidencias que sugiriesen que estas variables permitan “discriminar” entre pacientes fértiles e infértiles.

Variable	n	AUC	Intervalo confianza (95%)	Valor de corte	Sensibilidad=Especificidad
Colina	48	<b>0,763</b>	(0,597 ; 0,929)	1,17	0,75
Colina/Lípidos	48	<b>0,701</b>	(0,484 ; 0,919)	0,96	0,67

Tabla 27.- Área bajo la curva ROC (AUC) e intervalo de confianza del 95% teniendo en cuenta la presencia de datos correlacionados para la colina y la razón colina/lípidos como marcadores de diagnóstico de infertilidad del paciente



## RESULTADOS

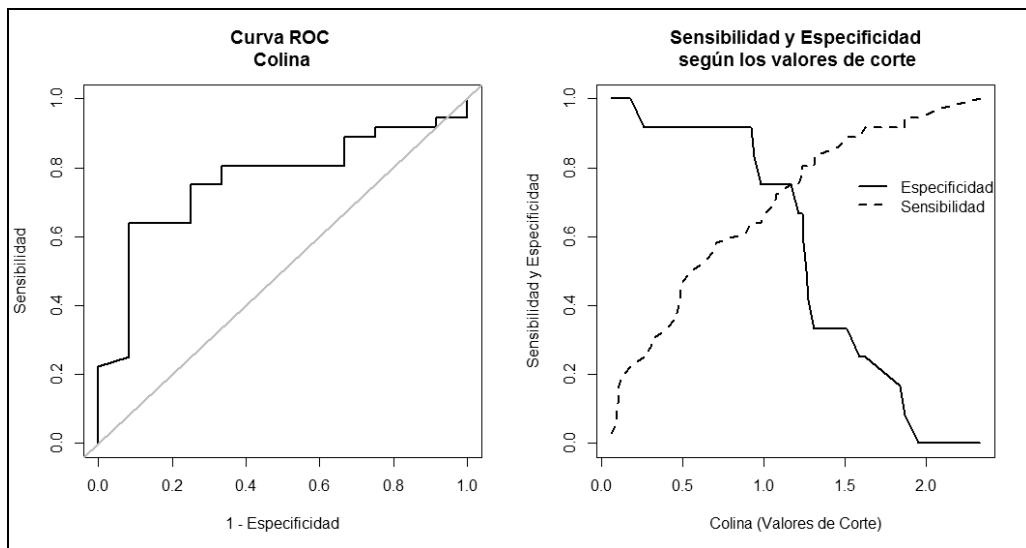


Figura 51.-Curva ROC empírica de colina como marcador de infertilidad del paciente y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte.

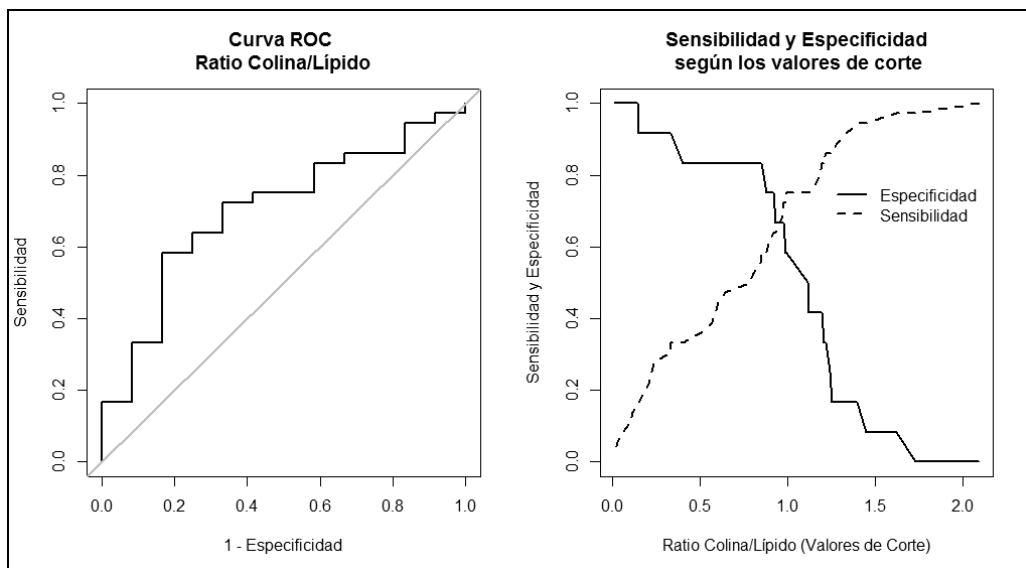


Figura 52.-Curva ROC empírica de la razón colina/lípidos como marcador de infertilidad del paciente, y valores de sensibilidad y especificidad en función de los puntos de corte.

## 6.5. ESPERMIOGRAMA

Se compararon las medias de los valores de colina, lípidos y creatina con la presencia de oligospermia, no encontrando valores estadísticamente significativos (Tabla 28).

Variable	No oligospermia (n=40) MEDIA (DE)	Si oligospermia (n=10) MEDIA (DE)	p
Colina	0,983 (0,603)	0,628 (0,646)	0,14
Creatina	0,371 (0,255)	0,485 (0,326)	0,36
Lípidos	1,290 (0,761)	2,160 (2,732)	0,79

Tabla 28.- Valores de la colina, creatina y lípidos según la presencia de oligospermia y comparación de medias mediante el test de Mann-Whitney para datos correlacionados.

## 6.6. RESUMEN DE RESULTADOS

En resumen, el volumen testicular, la colina y la razón colina /lípidos permiten discriminar entre testículos sanos y enfermos.

PATOLOGÍA DETECTADA EN RM (TESTE SANO/ENFERMO)	n	AUC	Intervalo confianza (95%)	Valor de corte	Sensibilidad=Especificidad
<b>VOLUMEN TESTICULAR</b>					
Fórmula de Lambert	49	<b>0,724</b>	(0,535;0,912)	22,5 cm <sup>3</sup>	0,719
Segmentación RM	49	<b>0,764</b>	(0,595;0,933)	16,4 cm <sup>3</sup>	0,722
<b>ESPECTROSCOPIA</b>					
Colina	48	<b>0,903</b>	(0,817; 0,989)	0,651	0,80
Colina/Lípidos	48	<b>0,833</b>	(0,712; 0,955)	0,795	0,80

Tabla 29.- Resumen de los valores de la curva ROC según la variable patología testicular en RM.

## RESULTADOS

Para diferenciar pacientes fértiles de infértiles sólo podremos utilizar los valores de colina y el ratio colina/lípidos.

DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDAD (PACIENTE FÉRTIL/INFÉRTIL)	n	AUC	Intervalo confianza (95%)	Valor de corte	Sensibilidad=Especificidad
<b>ESPECTROSCOPIA</b>					
Colina	48	<b>0,763</b>	(0,597 ; 0,929)	1,17	0,75
Colina/Lípidos	48	<b>0,701</b>	(0,484 ; 0,919)	0,956	0,667

Tabla 30.- Resumen de los valores de la curva ROC según la presencia de infertilidad.

Los valores de creatina y de lípidos no permiten discriminar ni patología testicular ni la presencia de infertilidad.

**DISCUSIÓN**



## 7. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado en el ámbito mundial un aumento en la incidencia de problemas de fertilidad, especialmente en los países desarrollados (134).

Las causas de la infertilidad pueden ser diversas, pero se estima que, en aproximadamente la mitad de los casos, está involucrado el factor masculino. A pesar de ello, la investigación en materia de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad en el varón ha avanzado poco (36). El éxito de algunas técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) contribuyó a solventar un elevado número de casos de infertilidad sin necesidad de impulsar la investigación básica y clínica del campo. Habitualmente, el diagnóstico del varón infértil se basa en la realización de un seminograma. Pero la infertilidad es compleja y el potencial diagnóstico del seminograma descriptivo es limitado ya que muchos varones infértiles presentan valores normales en la evaluación espermática y, con los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad, no resulta posible encontrar la causa de su disfunción.

La mayor limitación en el estudio de la infertilidad es la no existencia de una prueba de referencia que permita discriminar pacientes fértiles de infértiles. Este diagnóstico se realiza en muchos casos, únicamente tras una meticulosa investigación clínica. La llegada de la RM con técnica de espectroscopía al mundo de la imagen clínica podría abrir nuevas vías de investigación en relación a la infertilidad.

Nuestro estudio es el primero realizado en humanos con el fin de evaluar y cuantificar la espermatogénesis en pacientes diagnosticados de infertilidad y los resultados obtenidos muestran la eficacia de incorporar esta técnica en el manejo clínico de los mismos, al aportar información no sólo de la actividad espermatogénica sino también diferenciando según los valores de los picos detectados de los metabolitos si la causa es pretesticular, testicular y/o post-testicular, al encontrar valores inferiores de colina en las causas pretesticulares y testiculares y valores similares a los pacientes fértiles en las post-testiculares.

Asimismo, un hallazgo sorprendente en nuestro trabajo y no publicado previamente es el comportamiento de los tumores testiculares con espectroscopía, observando que condicionan una disminución de los picos de colina, datos no concordantes con la bibliografía existente en relación a los picos de colina presentes

## DISCUSIÓN

en la patología tumoral de otras áreas del cuerpo humano. La colina es un indicador de recambio celular y, por ello, en la mayoría de los tumores malignos, existe una elevada concentración. En el testículo, la mayor actividad celular es la derivada de la espermatogénesis y, por lo tanto, en condiciones normales existen picos elevados de colina. La presencia de patología tumoral testicular y/o cualquier otra causa que condicione una disfunción espermatogénica provocará una disminución de este pico.

Dividiremos la discusión en dos partes. En la primera, valoraremos la utilización de la RM como método para estimar el volumen testicular y en la segunda, sin duda la más novedosa, realizaremos una descripción exhaustiva de los resultados espectroscópicos con el fin de evaluar el papel de esta técnica en la infertilidad.

### **7.1. Volumen testicular**

El volumen testicular y las técnicas utilizadas para valorarlo han sido objeto de cierto tratamiento en la literatura científica. La importancia de la valoración del volumen testicular radica en dos grandes puntos. Por un lado, un incremento en su volumen ( $>4 \text{ cm}^3$ ) indica la llegada de la pubertad y, por otra parte, una asimetría en el volumen testicular puede ayudar al urólogo en la detección de patología gonadal (135-137). Además, existen artículos previos que relacionan el volumen testicular con la función testicular en base a que el 70% del parénquima son túbulos seminíferos (138,139).

Entre las técnicas utilizadas para la valoración del volumen, la más clásica es el orquidómetro de Prader, que consiste en medir el testículo comparándolo con modelos elipsoides ya determinados, pero también se puede utilizar la ecografía si es necesaria una prueba de imagen durante el estudio de la infertilidad. Un artículo experimental publicado en el año 2002 por Paltiel evaluó cuál era la mejor fórmula para medir el volumen testicular en ecografía, concluyendo que el método que otorga mayor precisión es la fórmula experimental de Lambert, consistente en multiplicar los valores de largo x ancho x alto x 0,71 (140).

En nuestro estudio hemos analizado el volumen testicular con dos métodos de valoración, utilizando en ambos casos la RM. Por un lado, el método de segmentación consiste en establecer un área en cada plano, siendo el volumen total la suma de los

mismos. Con este método se obtuvo un volumen medio de  $18,1 \text{ cm}^3$ . Por otra parte, usando la fórmula de Lambert el volumen medio fue de  $25,3 \text{ cm}^3$  (Tabla 17). Entre ambos métodos existe un coeficiente de correlación lineal de Pearson de 0,91. Sin embargo, la fórmula de Lambert proporciona valores sistemáticamente superiores como se observa en la Figura 36.

Existen varios artículos publicados que comparan el volumen de Prader con la ultrasonografía. Sakamoto y colaboradores estudiaron 938 testículos de pacientes infértiles con ambos métodos y demostraron que la ecografía con la fórmula de Lambert era el mejor, dado que el orquidómetro sobrestimaba los volúmenes en testes pequeños y los subestimaba en grandes. Los valores obtenidos por Sakamoto fueron para el teste derecho de  $18,7 \text{ cm}^3$  mediante orquidómetro y  $13,7 \text{ cm}^3$  con el uso de US; mientras que para el teste izquierdo de  $18$  y  $12,5 \text{ cm}^3$  respectivamente (141).

En nuestro trabajo, los valores obtenidos en RM usando la fórmula de Lambert y mediante segmentación son muy superiores a los observados por Sakamoto:  $25,9$  y  $19,1 \text{ cm}^3$  para el teste derecho y  $24,7$  y  $17 \text{ cm}^3$  para el izquierdo. Observamos, además, valores sistemáticamente superiores con el uso de la fórmula de Lambert en comparación con la segmentación en RM, existiendo una mayor diferencia en los testículos con volúmenes más elevados (Figura 40).

Con la introducción de la RM en el estudio de la patología testicular se incorpora también una nueva herramienta para la valoración de su volumen. El grupo de Kawai comparó el volumen obtenido en ecografía con el de la RM mediante el método de Cavalieri (esterotaxia en RM), concluyendo que los datos obtenidos con ambas técnicas de imagen son similares (142). En un estudio publicado recientemente por Takahashi se evaluó el papel de la RM en la detección de restos tumorales adrenales en 7 pacientes con hiperplasia adrenal congénita. Se estudió el volumen testicular con la fórmula de Lambert y con la segmentación RM y se evaluó también el volumen de los restos tumorales. El artículo mostró que existe una relación estadísticamente significativa entre el volumen tumoral obtenido tras cirugía y el volumen obtenido mediante segmentación RM. Además, estos autores obtuvieron un volumen medio testicular con el método de segmentación RM de  $18,5 \text{ ml}$  (valores similares a nuestro estudio) y encontraron también que la fórmula de Lambert sobrestima el volumen testicular. El artículo concluye que la RM es un método preciso tanto en la evaluación del volumen testicular como del volumen tumoral



## DISCUSIÓN

(143). En otras áreas del cuerpo, como en el hígado o el riñón, se utiliza ya la RM como método para estimar el volumen, aunque en relación al testículo tendrán que realizarse futuros trabajos (144, 145).

En nuestro estudio, si consideramos el método de Lambert como de referencia y calculamos el error relativo del método de segmentación con respecto a éste (figura 41), vemos que con la fórmula de Lambert sobrestima el volumen.

Yang y colaboradores estudian con PET y ecografía el efecto de la edad en el volumen testicular y en el metabolismo de la glucosa demostrando que el volumen y el metabolismo testicular están afectados significativamente por la edad con un ritmo diferente según las etapas del ciclo vital; existiendo un rápido aumento en el volumen testicular y en el metabolismo paralelo a la aparición de la pubertad y con una correlación positiva hasta la edad de 30-40 años. Entre 40 y 60 años, el volumen testicular y el metabolismo se mantienen relativamente constantes con sólo un mínimo deterioro. Después de los 60 años, el volumen testicular disminuye significativamente, mientras que el metabolismo de los testículos disminuye progresivamente hasta la edad de 90 años (146).

Nosotros no encontramos relaciones estadísticamente significativas entre la edad ni el IMC con el volumen testicular (Tabla 18). Cuando clasificamos la edad en dos grupos para correlacionarla con el volumen obtenemos una  $p > 0,005$  tanto con la fórmula de Lambert como con el método de segmentación (Tabla 19). Posiblemente esta ausencia de correlación se explique dado que el rango de edad de los pacientes de nuestra muestra oscilaba entre 21 a 58 años.

Arai y colaboradores establecieron una relación entre el volumen testicular y el número de espermatozoides y concluyeron que si el volumen testicular era inferior a  $10 \text{ cm}^3$  el paciente era azoospermico y que volúmenes inferiores a  $20 \text{ cm}^3$  se asociaban fuertemente a oligospermia (138). Du y colaboradores estudiaron el volumen testicular mediante ecografía para tratar de distinguir las azospermias obstructivas de las no obstructivas, encontrando que el volumen testicular era mayor en las azospermias obstructivas (media 16 ml) que en las no obstructivas (media de 8,6 ml) con una  $p < 0,001$  (147).

En nuestros resultados, aunque no existe una relación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de infertilidad y el volumen testicular con ninguno

de los métodos, con una  $p$  de 0,17 para la segmentación en RM y de 0,398 para el método de Lambert (Tabla 19), encontramos diferentes volúmenes testiculares según la clasificación de la infertilidad (Figura 42). Así, las causas pretesticulares presentaban un volumen testicular de 9,307 ml, las causas testiculares 17,815 ml y las causas pos-testiculares (siendo en nuestro estudio todas ellas azospermias obstructivas) de 24,38 ml, hallazgos que concuerdan con los datos de Du y con los datos de Arai (138,147).

Nuestro estudio muestra valores estadísticamente significativos entre los volúmenes testiculares y la presencia de patología testicular (Tabla 20 y figura 43) con una  $p=0,005$ . Así, los testículos sanos presentan un volumen medio de  $20,2 \text{ cm}^3$  y los testículos enfermos un volumen de  $14,2 \text{ cm}^3$ , mientras que los pacientes con varicocele presentan un volumen testicular de  $12 \text{ cm}^3$ . Estos hallazgos concuerdan con los datos publicados por Sakamoto en el año 2008 y por Patel y colaboradores (148, 137). Este último grupo realizó un estudio en 3202 pacientes, encontrando que la diferencia de tamaño testicular era 2 veces más común en hombres infértiles con varicoceles que en los hombres sin varicocele (32% vs 17%,  $p=0,001$ ), y observando, además, que los pacientes con varicocele izquierdo presentan un testículo más pequeño en un 89% de los casos (137). Hassan y colaboradores compararon un grupo control (pacientes sanos) con pacientes con varicoceles divididos en 4 grupos según su severidad y demostraron que el volumen testicular del grupo control era de 17 ml, existiendo una disminución progresiva del tamaño en función de la severidad del varicocele (149). Así, en el grupo 1 (varicocele subclínico) el volumen era de 15,8 ml, en el grupo 2 (varicocele grado I) de 14,9 ml, en el grupo 3 (varicocele grado II) de 13,5 ml y en el grupo 4 de 11,6 ml (varicocele grado III).

Un hallazgo novedoso de nuestro trabajo y no publicado previamente es la relación existente entre el volumen testicular y los metabolitos detectados en espectroscopía, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre la colina ( $p<0,001$ ) y el volumen testicular calculado por segmentación (Tabla 23), dato que podría indicar que el volumen tiene relación con la actividad espermatogénica. Esta hipótesis concordaría con los resultados publicados en el artículo de Yang (146) y con el grupo de Arai (138), como ya se ha mencionado previamente.

Sin embargo, no encontramos relaciones estadísticamente significativas entre el volumen, los lípidos ( $p=0,19$ ) y la creatina ( $p=0,21$ ).

## DISCUSIÓN

En conclusión, la RM es una nueva herramienta que permite determinar el volumen testicular, permitiendo además discriminar entre testículos sanos y enfermos con una sensibilidad y especificidad del 72% con el método de segmentación y del 71% con la fórmula de Lambert (Tabla 21).

### **7.2. Espectroscopía testicular**

#### **7.2.1. Colina**

El primer dato que analizaremos es la colina. La colina es un metabolito estudiado de manera rutinaria en  $^1\text{H}$ -ERM y ya implementado clínicamente en el estudio oncológico de diferentes áreas del cuerpo (93). Por definición, el pico de colina representa el nivel conjunto de la colina, fosfocolina, fosfatidilcolina y glicerofosfocolina, al no poder separarse unos elementos de otros. La elevación de este pico representa el aumento de la biosíntesis de fosfolípidos de membrana que ocurre tanto en la proliferación celular (por ejemplo en los tumores) (96, 97,150) como en la patología inflamatoria desmielinizante como demuestra el artículo de Mader y colaboradores (151).

En nuestro estudio observamos la presencia sistemática de colina en los testículos, con un valor medio de 0,91 (tabla 22). Aunque existe escasa literatura sobre la aplicación de la  $^1\text{H}$ -ERM en el parénquima testicular, varios artículos apoyan nuestros resultados. En primer lugar, el grupo de Yamaguchi y colaboradores realizaron un estudio en ratas donde evalúan los metabolitos detectados de manera rutinaria en el parénquima testicular, encontrando los mismos picos espectroscópicos: colina (3.21 ppm), creatina (3.03 ppm) y lípidos (0.89, 127 ppm) (122). En segundo lugar la aplicación de esta técnica en humanos, reflejada solamente en dos estudios previos: el artículo de Firat y colaboradores, que muestra la relación entre la espectroscopía y la pubertad, y el de Aaronson y colaboradores, que evalúa el papel de la  $^1\text{H}$ -ERM en las azospermias (121, 123).

Actualmente, la elevación de los picos y de la concentración de colina se utiliza en la práctica clínica para identificar meningiomas y astrocitomas (152), en el estudio del cáncer de mama (118-120) y en la evaluación de la glándula prostática (113-116). En estos tejidos, por regla general existe una diferencia notable y consistente entre el tejido normal y el tejido tumoral que siempre presenta valores

superiores de colina. Un artículo de Glunde y colaboradores, explica como el metabolismo alterado de la colina es un posible biomarcador de la oncogénesis, tanto en la detección de la patología tumoral como en la monitorización de la respuesta al tratamiento y en el desarrollo de nuevos fármacos diana que bloqueen esta vía metabólica (153).

Table 1 | Choline metabolite concentrations and choline enzyme expression and activity levels in human cancers

Cancer site	PCho		GPC		tCho		Enzyme expression	Enzyme activity
	Normal	Cancer	Normal	Cancer	Normal	Cancer		
Bladder	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CHKα ↑ <sup>176</sup>	CHKα ↑ <sup>176</sup>
Brain	0.48 ±0.08 (REF. 177)	0.91 ±0.20 (REF. 177)	0.86 ±0.11 (REF. 177)	0.68 ±0.17 (REF. 177)	0.64* ±0.10 (REF. 178) and 1.79 <sup>‡</sup> ±0.24 (REF. 177)	1.19 <sup>§</sup> ±0.30 (REF. 178) and 1.88 <sup>§</sup> ±0.33 (REF. 177)	ND	ND
Breast	0.03 ±0.03 (REF. 42)	0.79 ±0.55 (REF. 42)	0.04 ±0.04 (REF. 42)	0.28 ±0.20 (REF. 42)	0.07 ±0.07 (REF. 42)	1.07 ±0.75 (REF. 42)	CHKα ↑ <sup>38</sup> , CHT1 ↑ <sup>28</sup> , OCT2 ↑ <sup>28</sup> and PLD1 ↑ <sup>61</sup>	CT ↑ <sup>28</sup> , CHKα ↑ <sup>41</sup> , CCT inconclusive <sup>28</sup> and PLD ↑ <sup>60,61</sup>
Colon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	CTL1 ↑ <sup>24,27</sup> , CHKα ↑ <sup>38,40</sup> , CCT ↑ <sup>50</sup> and PLD2 ↑ <sup>64,65</sup>	CT ↑ <sup>27</sup> , CHKα ↑ <sup>40</sup> , CCT ↑ <sup>50</sup> , PLD2 ↑ <sup>64</sup> and PC-PLC ↓ <sup>50</sup>
Liver	0.17 ±0.11 (REF. 49)	1.36 ±0.50 (REF. 49)	2.46 ±0.37 (REF. 49)	0.59 ±0.15 (REF. 49)	ND	ND	CCT ↑ <sup>48</sup>	CT ↑ <sup>179</sup> , CCT ↑ <sup>48</sup> and PC-PLC ↑ <sup>78</sup>
Lung	Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>180,181</sup>		Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>181</sup>		Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>180,181</sup>		CHKα ↑ <sup>38,39</sup> , CTL1 ↑ <sup>26</sup> and OCT3 ↑ <sup>26</sup>	CHKα ↑ <sup>39</sup>
Ovary	Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>59</sup>		Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>59</sup>		Increased in tumour tissue versus normal tissue <sup>59</sup>		CHKα ↑ <sup>50</sup> , OCT3 ↓ <sup>50</sup> , CTL3 ↑ <sup>50</sup> , CCT ↓ <sup>50</sup> and PC-PLC ↑ <sup>50</sup>	CHKα ↑ <sup>50</sup> , PC-PLD ↑ <sup>50</sup> and PC-PLC ↑ <sup>50</sup>
Prostate	0.02 ±0.07 (REF. 182)	0.39 ±0.40 (REF. 182)	0.29 ±0.26 (REF. 182)	0.57 ±0.87 (REF. 182)	0.31 ±0.33 (REF. 182)	0.96 ±1.27 (REF. 182)	CHKα ↑ <sup>38</sup>	CT ↑ <sup>29</sup>

CCT, CTP:phosphocholine cytidyltransferase; CHKα, choline kinase-α; CHT1, choline transporter 1; CT, choline transport; CTL, choline transporter-like; GPC, glycerophosphocholine; ND, not determined; OCT, organic cation transporter; PCho, phosphocholine; PC-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase C; PLD, phospholipase D1; tCho, total-choline-containing compounds. \*Cortex. <sup>‡</sup>White matter. <sup>§</sup>Glioblastoma. <sup>¶</sup>Astrocytoma grade IV.

Figura 53. Tabla de los valores de colina recogida del artículo de Glunde y colaboradores.

En la mayoría de los estudios, como hemos visto, el pico de colina elevado representa un mayor recambio (*turn over*) celular y un mayor riesgo de malignidad. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio implican que el pico de la colina no puede ser evaluado como un criterio de malignidad en los testículos adultos ya que los niveles elevados de colina existen de manera natural en el parénquima testicular normal y están en relación con la actividad espermatogénica que ocurre en los túbulos seminíferos.

Nuestros datos confirman que existe una disminución de la colina en aquellos pacientes que presentan algún tipo de patología testicular en RM o que presentan infertilidad. Así, los valores de colina en los pacientes fértiles presentan una media de 1,31 frente a los infértiles que presentan valores muy inferiores, con una media de

## DISCUSIÓN

0,77 (Tabla 22). En los testículos sanos, el valor medio de colina es de 1,22 frente a 0,39 en los testículos enfermos (Tabla 24)

Firat y colaboradores publicaron en el año 2008 las curvas espectroscópicas obtenidas en 19 pacientes pre-púberes frente a 24 post-púberes, encontrando que con la adolescencia existe un marcado incremento del pico de colina, como consecuencia del inicio de la espermatogénesis, y una disminución del pico de lípidos, que podría representar el efecto de la testosterona en el tejido testicular secundario a los cambios histoquímicos iniciados en la pubertad (123).

En nuestro estudio y utilizando el mismo TE (31 ms), detectamos iguales picos espectroscópicos que Firat. Fue por ello que decidimos estudiar los valores de colina, creatina y lípidos. Al comparar los valores de colina detectados en los pacientes post-púberes de Firat (media: 0,88) con los valores de nuestra muestra en pacientes fértiles, observamos que los picos de colina son superiores (media: 1,31). Este valor disminuye discretamente si evaluamos los picos de colina considerando únicamente testículos sanos, siendo entonces de 1,21 (media=1,21).

Cuando comparamos los valores de colina de los testículos sanos (media: 1,21; DE: 0,546) con enfermos, encontramos valores estadísticamente significativos tanto con el test de Mann-Whitney para datos correlacionados con una  $p (<0,001)$  como con el análisis Bootstrap, demostrando que los testículos enfermos presentan sistemáticamente valores de colina inferiores (media 0,39; DE: 0,332) (Tabla 24). Este hecho podría estar en relación con la disminución de la espermatogénesis testicular. Gracias a estos hallazgos, podemos establecer un punto de corte del nivel de colina en 0,651, discriminando los testículos sanos de los enfermos con una sensibilidad y especificidad del 80% (Tabla 26)

Si realizamos el análisis de los niveles de colina con el diagnóstico de infertilidad encontramos también valores estadísticamente significativos tanto con el test de Mann-Whitney para datos correlacionados con una  $p (<0,046)$  como con el análisis Bootstrap. Los valores medios de colina para pacientes fértiles son de 1,31 (DE: 0,47) y para infértiles de 0,77 (DE: 0,61). Si utilizamos la variable infertilidad el punto de corte del nivel de colina para discriminar entre pacientes fértiles e infértiles con una sensibilidad y especificidad del 75% sería de 1,17 (Tabla 27).

Entre las causas de infertilidad, llama la atención la disminución de los niveles de colina en los tumores con una media de 0,40 (DE: 0,26), y en los testículos con presencia de varicocele de 0,651 (DE: 0,37) respectivamente. La disminución de los picos de colina en ambos casos se asocia a una disminución de la actividad espermatogénica.

En los pacientes con tumores testiculares, esta disminución de los picos de colina, como hemos visto previamente, es contrario a lo publicado en otros órganos y patologías en las que la presencia de altos picos de colina indica malignidad (154-156). Existe solamente un artículo previo publicado en el año 1987 por el grupo de Thomsen que estudia mediante RM y espectroscopía con fósforo a 6 pacientes con carcinoma in situ y a 5 voluntarios sanos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en los metabolitos de fósforo, pero al ser una técnica diferente no resulta comparable (157).

Por lo tanto, en el estudio del testículo no se puede aplicar el criterio de que los picos de colina se asocian a alta sospecha de malignidad. Sin embargo, esta aparente contradicción estaría en consonancia con lo que ocurre con otras técnicas de imagen como la difusión mediante RM que mide el movimiento browniano de las moléculas de agua, existiendo órganos que muestran una "restricción natural" a la difusión (como el testículo, la médula ósea y el bazo) debido a su alta celularidad (158-160).

Los pacientes con varicocele de nuestro estudio muestran una disminución de los niveles de colina (Tabla 22). La relación entre el varicocele e infertilidad siempre ha sido conflictiva, pero esta caída del pico de colina puede estar en relación a dos variables, bien a una disminución directa de la actividad espermatogénica, dado que esta entidad produce un daño testicular progresivo (53-56), o secundaria a una disminución del volumen testicular (148,149). Futuros estudios deberán realizarse post-tratamiento de esta entidad con el fin de evaluar si existe mejora de la fertilidad y, por tanto, de los picos de colina.

Si realizamos un análisis de los niveles de colina correlacionado con la clasificación de la infertilidad encontramos que las causas pretesticulares presentaban una disminución drástica de los valores de colina con una media de 0,09, comparadas con las causas testiculares que presentaban una media de 0,60. Las causas post-testiculares, que en nuestro estudio fueron azospermias obstructivas, presentaban

## DISCUSIÓN

valores medios de colina de 1,16, similares a los pacientes fértiles (Tabla 22). Estos hallazgos son explicables gracias a la fisiología. Las causas pretesticulares provocan una disminución de la producción hormonal, por lo que disminuyen los valores de testosterona y por tanto de la espermatogénesis. Las causas testiculares también pueden provocar una disminución de los picos de colina, como en los tumores y los varicoceles, al disminuir la espermatogénesis normal en el parénquima testicular. Contrariamente, en las causas post-testiculares obstructivas, no se afecta la espermatogénesis, sino que se trata de una obstrucción al paso del espermatozoide. Estos diferentes hallazgos en función de la patología de base pueden observarse en las figuras 54 y 55 que muestran respectivamente la caída del pico de colina si comparamos los valores de un paciente con azoospermia obstructiva por dilatación de la rete testis con otro con hipogonadismo hipogonadotrópico.

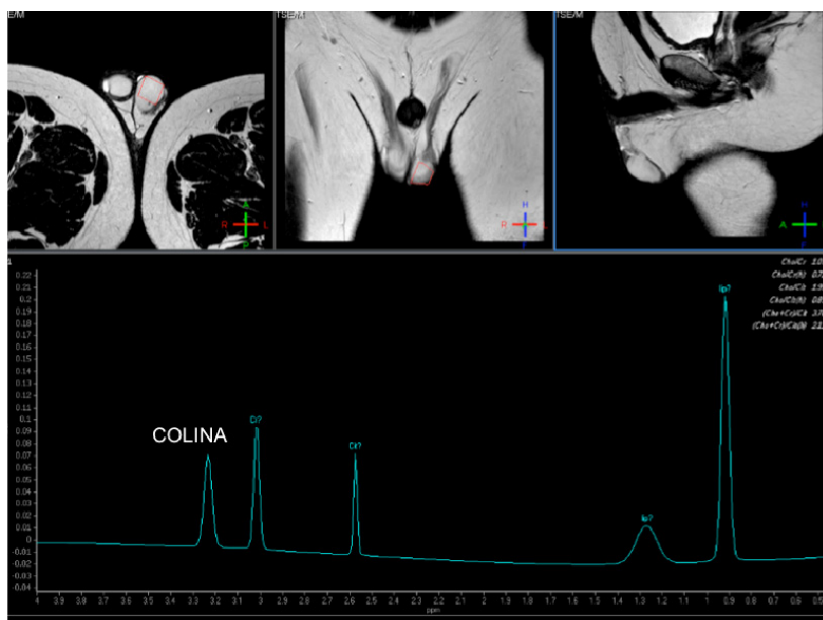


Figura 54. Representación de las curvas espectroscópicas de un paciente con infertilidad secundaria a un hipogonadismo hipogonadotrópico donde se observa una disminución de la concentración de colina al existir una disminución de la espermatogénesis testicular.

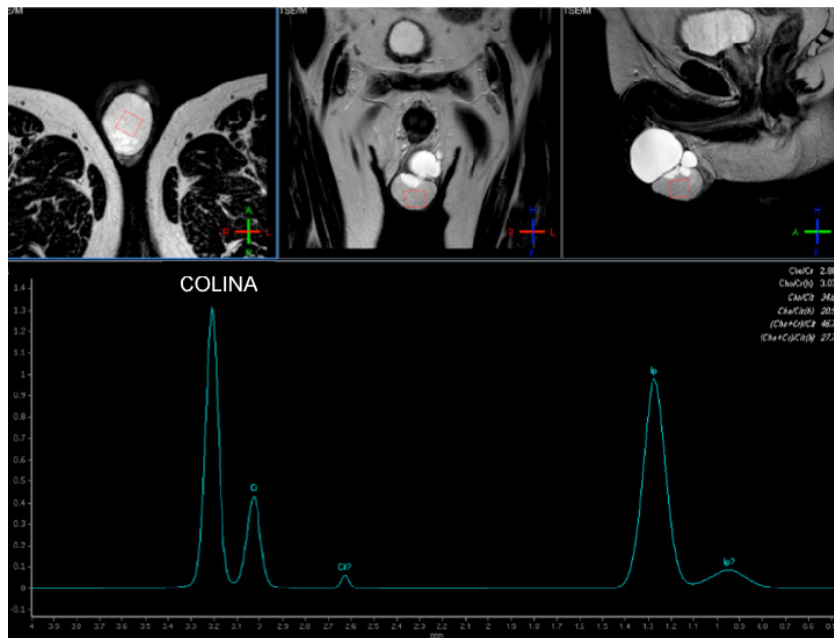


Figura 55. Representación de una curva espectroscópica normal en un paciente diagnosticado de infertilidad por azospermia obstructiva, observándose una elevada concentración de colina a no existir una disminución de la actividad espermatogénica.

Los datos obtenidos en nuestro estudio son concordantes con los resultados publicados previamente por Aaronson y colaboradores donde se evalúa el papel de la  $^1\text{H-ERM}$  en las azoospermias obstructivas y no obstructivas, relacionando los hallazgos con las biopsias testiculares (121). El artículo concluye que es posible caracterizar la espermatogénesis con  $^1\text{H-ERM}$  dado que existe una relación directa de la misma con los picos de colina. Estos hallazgos permiten un diagnóstico no invasivo de la azoospermia no obstructiva, que hasta el momento actual requería de pruebas invasivas (biopsia o PAAF) para determinar la presencia de espermatozoides en el parénquima testicular.

Por otra parte, el grupo de Gupta realiza un estudio de los picos espectroscópicos encontrados en el semen humano, clasificando a los pacientes en 2 grupos: 60 pacientes sanos y 125 pacientes infértiles con oligospermia y/o azospermia. Este estudio concluye que la combinación de los picos espectroscópicos de alanina, citrato, glicerosforilcolina, tirosina y fenilalanina, son capaces de discriminar no sólo entre pacientes sanos e infértiles con una precisión del 92,4% con  $^1\text{H-ERM}$  frente a un 94% por el método de laboratorio clínico, sino también entre



## DISCUSIÓN

pacientes azoospermicos y oligospermicos con una precisión del 92.9%, superior al 92,6% obtenido por el método de laboratorio clínico (161).

### 7.2.2. Creatina

Los valores de la creatina, reflejan la actividad metabólica, y suelen ser valores relativamente constantes en  $^1\text{H}$ -ERM (94,98)

Existen varios artículos sobre sus valores en el testículo pero realizando espectroscopía de fósforo ( $^{31}\text{P}$ -ERM) que detecta las señales de los metabolitos energéticos y de los productos de degradación, tales como trifosfatos de nucleósidos, difosfatos nucleósidos, la fosfocreatina (PCr) y fosfato inorgánico (Pi). En un artículo publicado por Van der Grond y colaboradores, muestran la utilidad de esta técnica a la hora de diferenciar entre pacientes sanos de aquellos con oligospermia, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre los ratios de fosfomonoéster/ATP (162).

Sin embargo, en la actualidad no existen valores previos publicados sobre los niveles de creatina en el parénquima testicular con  $^1\text{H}$ -ERM. En nuestro estudio no encontramos valores estadísticamente significativos ( $p = 0,067$ ) que permitan diferenciar testículos sanos de enfermos (Tabla 24). Los valores normales de creatina para los testículos sanos son de 0,38 (DE: 0,19) y para los testículos enfermos 0,44 (DE: 0,39). Tampoco vemos diferencias estadísticamente significativas con una  $p = 0,73$  entre pacientes fértiles e infértiles (Tabla 25), ni diferencias entre sus valores en relación con las patologías encontradas: tumor testicular: 0,46 (0,22), varicocele: 0,47 (0,50) (Tabla 22). Como muestran los datos, la creatina representa un pico relativamente constante en nuestra muestra.

### 7.2.3. Lípidos

En relación a los valores lipídicos, es importante conocer que con el inicio de la pubertad hay cambios significativos en los constituyentes del testículo, entre ellos la aparición de contenido graso, como el colesterol, que es el precursor de la testosterona (27). Además, el colesterol tiene un papel en la isquemia-reperfusión de

las lesiones por medio de la peroxidación lipídica (123). Por todo ello, el contenido de lípidos es de interés en la espectroscopía testicular. En el estudio de Firat se observaba una disminución de los valores lipídicos con el inicio de la pubertad que se interpreta como un aumento en la síntesis de testosterona. Un aumento importante de la síntesis de testosterona puede agotar la reserva lipídica en el parénquima testicular, dado que el colesterol es su precursor. Este hecho afectaría a los valores de los picos metabólicos correspondientes a los lípidos.

En nuestro estudio, valoramos el pico de lípidos de metileno a 1.3, dado que los picos de metilo a 0.9 no aparecían de manera constante en la muestra. No podemos comparar nuestros datos con artículos previos, al no encontrar publicaciones al respecto.

Si analizamos los valores de lípidos entre testes sanos frente a enfermos (tabla 22), no encontramos valores estadísticamente significativos ( $p=0,161$ ), pero podemos observar que los testes sanos presentan un valor medio de 1,38 (DE: 0,678) y los testes enfermos un valor de 1,61 (DE: 2,18). Hay que destacar que cuando evaluamos el comportamiento lipídico de las diferentes patologías (Tabla 22), observamos que en los tumores testiculares existe un aumento del pico espectroscópico de metileno alcanzado valores de 2,45 (2,77) y en el varicocele encontramos una disminución del mismo con un valor de 0,862 (0,436).

En un principio, se podría pensar que el aumento de los lípidos se produciría solamente en los tumores productores hormonales, derivado de un aumento de la reserva de cristales de colesterol, pero no fue así, encontramos valores elevados en ambos tipos de tumores. Existe literatura previa que atribuye la acumulación citoplasmática de triglicéridos en las células cancerígenas a procesos moleculares diferentes como la hipoxia, la degeneración mitocondrial, la detención del crecimiento celular o la apoptosis (163,164). Incluso, en los tumores cerebrales se han detectado niveles significativamente más altos de lípidos de metileno en los gliomas de alto grado en comparación con los gliomas de bajo grado, lo que sugiere una posible aplicación de la señal de lípidos a 1,3 ppm en la clasificación del tumor (165). Otras vías de investigación sugieren que la presencia de lípidos intratumorales se correlaciona con una mayor resistencia a la respuesta al tratamiento (165).

En relación al varicocele, se observó una disminución de los picos espectroscópicos de lípidos. En un artículo previo de Sultan y colaboradores se

## DISCUSIÓN

compararon los niveles de colesterol en pacientes sanos con los de aquéllos que presentaban varicocele, concluyendo que los pacientes con varicocele tenían niveles séricos de colesterol significativamente inferiores (166). En otro artículo, Sheriff estudió la composición lipídica de los testículos humanos en los pacientes con varicocele, y encontró que existía un aumento del colesterol total y de los glicéridos en estos testículos comparado con el grupo control, hallazgo que sugería la no utilización de ésteres de colesterol para la biosíntesis de andrógenos. Esta deficiencia de andrógenos daría lugar a una inhibición de la espermatogénesis como se muestra en las biopsias testiculares. Los lípidos se modifican cuando existe una alteración de la espermatogénesis y de la esteroidogénesis, por lo que podrían considerarse un valor importante de la función testicular (167).

### **7.3. Espermiograma**

Se estudió también la correlación de los valores de colina, creatina y lípidos en los pacientes con oligoespermia no encontrando valores estadísticamente significativos (Tabla 28). Estos hallazgos son coherentes con los descritos previamente dado que la oligoespermia puede estar presente tanto en pacientes con infertilidad post-testicular por causas obstructivas como en aquellos con verdadera afectación de la espermatogénesis.

### **7.4. Futuras líneas de Investigación**

Nuestro estudio abre futuras líneas de investigación:

1. Implantar una herramienta diagnóstica de la infertilidad no invasiva que permita discriminar pacientes fértiles de infértiles.
2. La posibilidad de caracterizar en función de las curvas espectroscópicas las diferentes causas de infertilidad.
3. La capacidad de discriminar entre azoespermia obstructiva y no obstructiva sin tener que realizar pruebas invasivas.
4. Determinar el área de mayor actividad espermatogénica durante la realización de biopsias testiculares con el fin de asegurar el éxito de las técnicas de fertilización in vitro (FIV/ICSI).
5. Monitorizar la respuesta al tratamiento.

6. Evaluar futuros tratamientos diana en aquellos casos de infertilidad primaria sin causa corregible.
7. Evaluar la recuperación de la espermatogénesis en aquéllos pacientes que están sometidos a tratamiento gonadotóxicos, como por ejemplo la quimioterapia, y que desean descendencia.



**CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

Dados los resultados de la presente tesis podríamos establecer que:

- La resonancia magnética con espectroscopía permite identificar la patología testicular.
- La resonancia magnética con espectroscopía permite una cuantificación indirecta de la espermatogénesis.
- Los metabolitos detectados mediante esta técnica, como la colina y la razón colina/lípidos, permiten discriminar los testículos sanos de los enfermos.
- La colina y la razón colina/lípidos permiten discriminar entre pacientes fértiles e infértiles.
- El valor del pico de colina resulta de ayuda en la diferenciación entre las distintas causas de infertilidad: pretesticular, testicular y post-testicular.
- El volumen testicular permite discriminar entre testículos sanos de enfermos.





## 8. CONCLUSIONS

The results of this investigation show that:

- Magnetic resonance spectroscopy allows to identify testicular pathology.
- Magnetic resonance spectroscopy allows indirect quantification of spermatogenesis.
- The metabolites detected by this technique, such as choline and the choline / lípido ratio discriminate between healthy and diseased testes.
- Choline and the choline / lipid ratio discriminate between fertile and infertile patients.
- The value of the choline peak is helpful to differentiate between different causes of infertility: pretesticular, testicular and posttesticular.
- Testicular volume discriminates between healthy and diseased testes.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO 1992a. Global health situation and projections-estimates. Geneve.
2. Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow. The ESHRE Capri Workshop. European Society for Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 1996; 11: 1779-807.
3. Celso A.C. Los ocho libros de la Medicina. Vol. 2. Barcelona: Editorial Iberia; 1966.
4. Küss R, Gregoir W. Histoire Illustrée de l'Urologie de l'Antiquité à nos jours. París: Les Editions Roger Dacosta; 1988. p. 484-90.
5. Lain Entralgo, P. Historia de la medicina moderna y contemporánea. Madrid: Editorial Científico-médica; 1963.
6. Karamanou M, Poulakou-Rebelakou E, Tzetis M, Androutsos G. Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. Rev Argent Microbiol 2010; 42: 311-14.
7. García Navas R, Maganto Pavón E, García-Ortells D, Gómez García I, Sanz Mayayo E, Escudero Barrilero A. Infertility and varicocele through history. Arch Esp Urol 2004; 57: 876-82.
8. Jones HW Jr. IVF: past and future. Reprod Biomed Online 2003; 6: 375-81.
9. Clarke GN. A.R.T. and history, 1678-1978. Hum Reprod 2006; 21: 1645-50.
10. Greenhall E, Vessey M: The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. Fertil Steril 1990; 54: 978-83.
11. De Kretser DM. Male infertility. Lancet 1997; 349: 787-90.
12. Healy DL, Trounson AO, Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. Lancet 1994; 343: 1539-44.
13. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. Fertil Steril 1991; 56:192-3.

## BIBLIOGRAFÍA

14. Maruani P, Schwartz D. Sterility and fecundability estimation. *J Theor Biol* 1983; 105: 211-9.
15. Guttmacher AF. Factors affecting normal expectancy of conception. *J Am Med Assoc* 1956; 161: 855-60.
16. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 303-12.
17. Infertilidad y Tratamientos. España 2008. La necesidad de un compromiso decidido de las administraciones públicas un problema de nuestro tiempo. <http://www.adeces.org/Infertilidad%20y%20tratamientos%20en%20Espa%F1a%202008.pdf>. Publicado el 24-06-2008. Acceso el 6 de Julio del 2012.
18. Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod* 2002; 17: 1399-403.
19. Cruz JR, Gindoff PR. Age and reproduction. *Reproductive Medicine Review* 1999; 7: 61-9.
20. Sauer M, Paulson R, Lobo R. A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. *New Engl J Med* 1990; 323: 1157.
21. Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: Definición, frecuencia y etiología. In: Vanrell JA, Calaf J, Balasch J, Viscasillas. P, editores. *Fertilidad y Esterilidad Humanas*. Barcelona: Editorial Masson; 1999. p.1-21.
22. Sofikitis N, Migayana I, Dimitriadis D. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030.
23. Westrom L. STD and infertility. *Sexually Transmitted Diseases* 1994; 21: S32-S37.
24. Lipert TH. *Anatomía con orientación clínica*. Madrid: Editorial Marban; 2005.
25. Netter F. *Sistema reproductor*. Colección Netter de ilustraciones médicas Tomo 2. Madrid: Editorial Masson; 1979.

26. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, Editores. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994: 1363-434.
27. O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill JD, editor. *Physiology of Reproduction*. Vol. 3. Amsterdam: Elsevier; 2006: 1017–1069.
28. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117–21.
29. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119–24.
30. Huyghe E, Izard V, Rigot JM, Pariente JL, Tostain J. Evaluation de l'homme infertile: recommandations AFU 2007. *Prog Urol* 2008; 18: 95-101.
31. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. The choice and outcome of the fertility treatment of 38 couples in whom the male partner has a Yq microdeletion. *Hum Reprod* 2005; 20: 1887- 96.
32. Meza-Vázquez HE, Rosas-Vargas H, Vite-Velázquez EJ, De Alba-Mayans AG. Case report. Patient with varicocele & oligozoospermia with Y chromosome microdeletion: AZFb+c. *Actas Urol Esp* 2007 Mar; 31: 285-8.
33. Staerman F, Hermabessiere J. *Guide pratique de l'infertilité masculine*. Progrès en Urologie, monographie, 1993.
34. Hubert J, Pascal V, Cormier L, Gerard H. *Exploration Clinique et paraclinique du testicule*. EMC Néphrologie-Urologie 1997; 18- 601-C-10: 15.
35. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male*. Cambridge: University Press; 2000. p.91.
36. Turek PJ, Pera RA. Current and future genetic screening of male infertility. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 767-92.



## BIBLIOGRAFÍA

37. Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am* 2004; 88: 367-85.
38. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF Jr. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 560-5.
39. Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J, et al. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 1752-5.
40. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991; 353: 529-36.
41. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992; 326: 179-83.
42. Wu SM, Leschek EW, Rennert OM, Chan WY. Luteinizing hormone receptor mutations in disorders of sexual development and cancer. *Front Biosci* 2000; 5: 343-52.
43. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D, et al. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 751-55.
44. Griffin JE. Androgen resistance: the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 1992; 326: 611-18.
45. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995; 16: 271-321.
46. Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70: 397-411.

47. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, Veeck LL, Zaninovic N, Menendez S, et al. Births alter intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 588-90.
48. Therman ESM. *Human chromosomes: structure behavior and effects*. 3rd edition. New York: Springer-Verlag; 1993.
49. Nodar, F de Vincentiis, Brugo Olmedo S, Papier S, et al. Birth of twin males with normal karyotype after intracytoplasmic sperm injection with use of testicular spermatozooids from a non-mosaic patient with Klinefelter's. *Fertil Steril* 1999; 71: 1149-52.
50. Belloli G, D'Agostino S, Pesce C, Fantuz E. Varicocele in childhood and adolescence and other testicular anomalies: an epidemiological study. *Pediatr Med Chir* 1993; 15: 159-62.
51. Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin North Am* 1987; 14: 499-513.
52. Jarow JP, Coburn M, Sigman M. Incidence of varicoceles in men with primary and secondary infertility. *Urology* 1996; 47: 73-6.
53. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981; 68: 39-45.
54. MacLeod JHR. The effect of hyperperexia on spermatozoa counts in men. *Endocrinology* 1941; 28: 780.
55. Peng BC, Tomashefsky P, Nagler HM. The cofactor effect: varicocele and infertility. *Fertil Steril* 1990; 54:143-48.
56. Cayan S, Kadioglu A, Orhan I, Kandirali E, Tefekli A, Tellaloglu S. The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int* 1999; 84: 1046-9.

## BIBLIOGRAFÍA

57. Cayan S, Erdemir F, Ozbey I, Turek PJ, Kadioglu A, Tellaloglu S. Can varicocelectomy significantly change the way couples use assisted reproductive technologies? *J Urol* 2002; 167:1749-52.
58. Villumsen AL, Zachau-Christiansen B. Spontaneous alterations in position of the testes. *Arch Dis Child* 1966; 41:198-200.
59. Chung E, Brock GB. Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can Urol Assoc J* 2011; 5: 210-4.
60. Trussel JC, Lee PA. The relationship of cryptorchidism to fertility. *Curr Urol Rep* 2004; 5:142-5.
61. Chan PT, Palermo GD, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmic sperm injection in the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 1632-7.
62. Barthelemy C. Indications de la recherche des anticorps anti spermatozoïdes. *Andrologie* 2003; 13:70-80.
63. Schlosser J, Nakib I, Carré-Pigeon F, Stearman F. Infertilité masculine: stratégie de prise en charge. *EMC Urologie* 2007; 18-760-A-12. Doi:10.1016/S0000-0000(07)46851-6
64. Menge AC, Beitner O. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* 1989; 51: 486-92.
65. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, YoungLai EV. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* 1993; 8: 592-8.
66. Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID. The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod* 1992; 7: 95-8.

67. Bandoh R, Yamano S, Kamada M, Daitoh T, Aono T. Effect of sperm immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1992; 57: 387–92
68. Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Inhibition of human sperm-zona pellucida and spermolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil Steril* 1991; 55: 440-2.
69. Jockenhoevel F. Male hypogonadism. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2004.p.188.
70. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 2nd edition. Cambridge: University Press; 1987. p. 67.
71. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16: 231-45.
72. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al; National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8; 345: 1388-93.
73. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995 May; 10: 1123-9.
74. Bassas Arnau L. Exploration of testicular function. *Endocrinol Nutr*. 2009 Jan; 56(1): 18-31.
75. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Sheppers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but can not predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2496-501.

## BIBLIOGRAFÍA

76. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Takao T, Fujita K, Takada S et al. Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2004; 172: 1944-7.
77. Poirot C, Cherruau B. Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005; 39: 225-41.
78. Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15: 702-8.
79. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 2000; 92: 255-66.
80. Natali A, Turek PJ. An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology* 2011; 77: 1027-34.
81. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-5.
82. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical review: state of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 9: 1013-24.
83. Bourrouillou G, Bujan L, Calvas P, Colombies P, Mansat A, Pontonnier F. Role and contribution of karyotyping in male infertility. *Prog Urol* 1992; 2: 189-95.
84. Miskin M, Bain J. B-mode ultrasonic examination of the testes. *J Clin Ultrasound* 1974 Dec; 2: 307-11.
85. Sánchez Guerrero A, Villor Esnal R, Pamplona Casamayor M. Radiological diagnosis: scrotal ultrasound and Doppler ultrasound in the diagnosis of male infertility. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 905-20.
86. Brunereau L, Fauchier F, Fernandez P, Blais G, Royere G, Pourcelot L, et al. Sonographic evaluation of human male infertility. *J Radiol* 2000 Dec; 81:1693-701.

87. Kim W, Rosen MA, Langer JE, Banner MP, Siegelman ES, Ramchandani P. US MR imaging correlation in pathologic conditions of the scrotum. *Radiographics* 2007; 27: 1239-53.
88. Woodward PJ, Sohaey R, O'Donoghue MJ, Green DE. Tumors and tumorlike lesions of the testis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 2002; 22: 189-216.
89. Muglia V, Tucci S, Elias J, Trad CS, Bilbey J, Cooperberg PL. Magnetic resonance imaging of scrotal diseases: when it makes the difference. *Urology* 2002; 59: 419-23.
90. Serra AD, Hricak H, Coakley FV, Kim B, Dudley A, Morey A, et al. Inconclusive clinical and ultrasound evaluation of the scrotum: impact of magnetic resonance imaging on patient management and cost. *Urology* 1998; 51: 1018-102
91. Fernández-Pérez GC, Tardáguila FM, Velasco M, Rivas C, Dos Santos J, Cambronero J, et al. Radiologic findings of segmental testicular infarction. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 1587-93.
92. Pretorius E. MRI of the male pelvis and bladder. In: Siegelman ES, ed. *Body MRI*. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders, 2005; 372–86.
93. Kwock L, Smith JK, Castillo M, Ewend MG, Collichio F, Morris DE, et al. Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 859-68.
94. Proctor WG, YU FC. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Phys Rev* 1950; 77: 717
95. Hajek M, Dezortova M. Introduction to clinical in vivo MR spectroscopy. *Eur J Radiol* 2008; 67: 185-93.
96. Cecil KM, Jones BV. Magnetic resonance spectroscopy of the pediatric brain. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 2001; 12: 435-52.
97. Castillo M, Kwock L, Mukherji S. Clinical application of proton MR spectroscopy. *AJNR* 1996; 17:1-15.

## BIBLIOGRAFÍA

98. Arnold D, Wolinsky JS. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. In: American Academy of Neurology. Syllabi on CD ROM; 1999.
99. Magalhaes A, Godfrey W, Shen Y, Hu J, Smith W. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors correlated with pathology. *Acad Radiol* 2005; 12: 51-7.
100. Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A. Accurate, non-invasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med* 1996; 2: 323-5.
101. Möller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U, et al. Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology* 2002; 44: 371-81.
102. Croteau D, Scarpace L, Hearshen D, Gutierrez J, Fisher JL, Rock JP et al. Correlation between magnetic resonance spectroscopy imaging and image-guided biopsies: semiquantitative and qualitative histopathological analyses of patients with untreated glioma. *Neurosurgery* 2001; 49: 823.
103. Chen CY, Lirng JF, Chan WP, Fang CL. Proton magnetic resonance spectroscopy-guided biopsy for cerebral glial tumors. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 448-58
104. Arnold D, Wolinsky JS. Proton magnetic resonance spectroscopy for the diagnosis and management of cerebral disorders. In: American Academy of Neurology. Syllabi on CD ROM; 2002.
105. García- Segura JM, Izal E, Viaño J. Aplicaciones de la espectroscopía por resonancia en el estudio de la epilepsia. *Rev Neurol Clin* 2000; 1: 303-25.
106. Castillo M, Smith K, Kwock L. Proton MR spectroscopy in patients with acute temporal lobe seizures. *AJNR* 2001; 22: 152-7.

107. Serles W, Li LM, Antel SB, Cendes F, Gotman J, Olivier A, et al. Time course of postoperative recovery of N acetyl aspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42: 190-7.
108. Chantal S, Labelle M, Bouchard R, Braun CM, Boulanger Y. Correlation of regional proton magnetic resonance spectroscopic metabolic changes with cognitives deficits in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002; 59: 955-62.
109. Malhi G, Valenzuela M, Wen W, Sachdev P. Magnetic resonance spectroscopy and its applications in psychiatry. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 2002; 36: 31-43.
110. Block W, Jessen F, Traber F, Flacke S, Manka C, Lamerichs R. Regional N-acetylaspartate reduction in the hippocampus detected with fast proton magnetic resonance spectroscopic imaging in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002; 59: 828-34.
111. Mainero C, De Stefano N, Iannucci G, Sormani MP, Guidi L, Federico A, et al. Correlates of MS disability assessed in vivo using aggregates of MR quantities. *Neurology* 2001; 56: 1331-4.
112. Parsons M, Li T, Barber P, Yang Q, Darby DG, Desmond PM, et al. Combined 1H MR spectroscopy and diffusion-weighted MRI improve the prediction of stroke outcome. *Neurology* 2000; 55: 498-506.
113. Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Yu KK, Sokolov DL, Huang LR, et al. Prostate cancer: localization with three-dimensional proton MR spectroscopic imaging-clinicopathologic study. *Radiology* 1999; 213: 473–80.
114. Padhani AR. Integrating multiparametric prostate MRI into clinical practice. *Cancer Imaging* 2011;11:S27-37. Doi: 10.1102/1470-7330.2011.9007
115. Claus FG, Hricak H, Hattery RR. Pretreatment evaluation of prostate cancer: role of MR imaging and 1H MR spectroscopy. *Radiographics* 2004; 24 (suppl.1): S167-80.
116. Vilanova JC, Comet J, Barceló-Vidal C, Barceló J, López-Bonet E, Maroto A, et al. Peripheral zone prostate cancer in patients with elevated PSA levels and



## BIBLIOGRAFÍA

- low free-to-total PSA ratio: detection with MR imaging and MR spectroscopy. *Radiology* 2009 Oct; 253: 135-43.
117. Jacobs MA, Ouwerkerk R, Wolff AC, Stearns V, Bottomley PA, Barker PB, et al. Multiparametric and multinuclear magnetic resonance imaging of human breast cancer: current applications. *Technol Cancer Res Treat* 2004; 3: 543-50.
  118. Katz-Brull R, Lavin PT, Lenkinski RE. Clinical utility of proton magnetic resonance spectroscopy in characterizing breast lesions. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1197-203.
  119. Huang W, Fisher PR, Dulaimy K, Tudorica LA, O'Hea B, Button TM. Detection of breast malignancy: diagnostic MR protocol for improved specificity. *Radiology* 2004; 232: 585-91.
  120. Sardanelli F, Fausto A, Podo F. MR spectroscopy of the breast. *Radiol Med*. 2008 Feb; 113(1): 56-64
  121. Aaronson DS, Iman R, Walsh TJ, Kurhanewicz J, Turek PJ. A novel application of <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2010; 25: 847-52
  122. Firat AK, Uğraş M, Karakaş HM, Erdem G, Kurus M, Ugras M, et al. <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of the normal testis: preliminary findings. *Magn Reson Imaging* 2008; 26: 215-20.
  123. Yamaguchi M, Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Minami M. In vivo localized <sup>1</sup>H MR spectroscopy of rat testes: stimulated echo acquisition mode (STEAM) combined with short TI inversion recovery (STIR) improves the detection of metabolite signals. *Magn Reson Med* 2006; 55: 749-54.
  124. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 184-96.

125. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al; EAU Working Group on Male Infertility. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol* 2012; 62: 324-32.
126. Salgado-Ugarte IH, Shimizu M, Taniuchi T. Exploring the shape of univariate data using kernel density estimators. *Stata Technical Bulletin* 1993; 16: 8-19.
127. Efron B, Tibshirani RJ. *An introduction to the bootstrap*. New York: Chapman & Hall; 1993.
128. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8: 135-60.
129. Hardin JW, Hilbe JM. *Generalized Estimating Equations*. Boca Raton FL: Chapman & Hall/CRC; 2003.
130. Rosner B, Glynn RJ, Lee ML. Extension of the rank sum test for clustered data: two-group comparisons with group membership defined at the subunit level. *Biometrics* 2006; 62: 1251-9.
131. Obuchowsky NA. Receiver Operating Characteristic curves and their use in radiology. *Statistical Concepts Series*. *Radiology* 2003; 229 :3-8.
132. Obuchowski NA. Nonparametric analysis of clustered ROC curve data. *Biometrics* 1997 Jun; 53: 567-78.
133. Beam CA. Analysis of clustered data in receiver operating characteristic studies. *Stat Methods Med Res* 1998 ;7: 324-36.
134. Caballero P, Núñez-Calonge R. Epidemiología de la infertilidad. *Actualidad en Reproducción* 1992; 1: 6-20.
135. Wu FC, Brown DC, Butler GE, Stirling HF, Kelnar CJ Early morning plasma testosterone is an accurate predictor of imminent pubertal development in prepubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 26-31.
136. Costabile RA, Skoog S, Radowich M. Testicular volume assessment in the adolescent with a varicocele. *J Urol* 1992; 147: 1348-50.

## BIBLIOGRAFÍA

137. Patel SR, Sigman M. Prevalence of testicular size discrepancy in infertile men with and without varicoceles. *Urology* 2010; 75: 566-8.
138. Arai T, Kitahara S, Horiuchi S, Sumi S, Yoshida K. Relationship of testicular volume to semen profiles and serum hormone concentrations in infertile Japanese males. *Int J Fertil Womens Med* 1998; 43: 40-7.
139. Takihara H, Sakatoku J, Fujii M, Nasu T, Cosentino MJ, Cockett AT. Significance of testicular size measurement in andrology. I. A new orchimeter and its clinical application. *Fertil Steril* 1983; 39: 836-40.
140. Paltiel HJ, Diamond DA, Di Canzio J, Zurakowski D, Borer JG, Atala A. Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. *Radiology* 2002; 222: 114.
141. Sakamoto H, Saito K, Ogawa Y, Yoshida H. Testicular volume measurements using Prader orchidometer versus ultrasonography in patients with infertility. *Urology* 2007; 69: 158-62.
142. Kabay S, Yucel M, Ozden H, Yaylak F, Ozbek O, Gumusalan Y. Magnetic resonance imaging is a complementary method to stereological measurement of testicular volume. *Urology* 2009; 73: 1131-5.
143. H.L. Claahsen-van der Grinten. Adrenal Rest Tumours in Congenital Adrenal Hyperplasia [ tesis doctoral ]. Radboud Universiteit Nijmegen, 2007.
144. Hermoye L, Laamari-Azjal I, Cao Z, Annet L, Lerut J, Dawant BM, et al. Liver segmentation in living liver transplant donors: comparison of semiautomatic and manual methods. *Radiology* 2005; 234: 171-8.
145. Bakker J, Olree M, Kaatee R, de Lange EE, Moons KG, Beutler JJ, et al. Renal volume measurements: accuracy and repeatability of US compared with that of MR imaging. *Radiology* 1999; 211: 623-8.
146. Yang H, Chryssikos T, Houseni M, Alzeair S, Sansovini M, Iruvuri S, et al. The effects of aging on testicular volume and glucose metabolism: an investigation with ultrasonography and FDG-PET. *Mol Imaging Biol* 2011; 13: 391-8.

147. Du J, Li FH, Guo YF, Yang LM, Zheng JF, Chen B, et al. Differential diagnosis of azoospermia and etiologic classification of obstructive azoospermia: role of scrotal and transrectal US. *Radiology* 2010; 256: 493-503.
148. Sakamoto H, Ogawa Y, Yoshida H. Relationship between testicular volume and varicocele in patients with infertility. *Urology* 2008; 71: 104-9.
149. Hassan A, Gad HM, Mostafa T. Radiologically assessed testicular changes in infertile males with varicocele. *Andrologia* 2011; 43: 307-11.
150. Ruiz-Cabello J, Cohen JS. Phospholipid metabolites as indicators of cancer cell function. *NMR Biomed* 1992; 5: 226-33.
151. Mader I, Rauer S, Gall P, Klose U. (1) H MR spectroscopy of inflammation, infection and ischemia of the brain. *Eur J Radiol* 2008; 67: 250-7.
152. Lehnhardt FG, Bock C, Röhn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a 1H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed* 2005 Oct; 18: 371-82.
153. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 835-48.
154. Ter Voert E, Heijmen L, van Laarhoven H, Heerschap A. In vivo magnetic resonance spectroscopy of liver tumors and metastases. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 5133-49.
155. Esseridou A, Di Leo G, Sconfienza LM, Caldiera V, Raspagliesi F, Grijuela B, Hanozet F, Podo F, Sardanelli F. In vivo detection of choline in ovarian tumors using 3D magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol* 2011; 46: 377-82.
156. Glunde K, Bhujwala ZM. Metabolic tumor imaging using magnetic resonance spectroscopy. *Semin Oncol* 2011; 38: 26-41.
157. Thomsen C, Jensen KE, Giwercman A, Kjaer L, Henriksen O, Skakkebaek NE. Magnetic resonance: in vivo tissue characterization of the testes in patients with carcinoma-in-situ of the testis and healthy subjects. *Int J Androl* 1987; 10: 191-8.

## BIBLIOGRAFÍA

158. Colagrande S, Carbone SF, Carusi LM, Cova M, Villari N. Magnetic resonance diffusion-weighted imaging: extraneurological applications. *Radiol Med* 2006; 111: 392-419.
159. Maki D, Watanabe Y, Nagayama M, Ishimori T, Okumura A, Amoh Y, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the detection of testicular torsion: feasibility study. *J Magn Reson Imaging* 2011; 34: 1137-42.
160. Padhani AR. Whole-body diffusion MRI- how to do it. *Cancer Imaging* 2011; 11: S155. Doi: 10.1102/1470-7330.2011.9039
161. Gupta A, Mahdi AA, Ahmad MK, Shukla KK, Jaiswer SP, Shankhwar SN. <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 54:106-13.
162. Van der Grond J, Laven JS, te Velde ER, Mali WP. Abnormal testicular function: potential of P-31 MR spectroscopy in diagnosis. *Radiology* 1991; 179: 433-6.
163. Hakumaki JM, Poptani H, Sandmair AM, Yla-Herttuala S, Kauppinen RA. <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med* 1999; 5: 1323-7.
164. Al-Saffar NM, Titley JC, Robertson D, et al. Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 963-70.
165. Gillies RJ, Morse DL. In vivo magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 287-326.
166. Sheriff DS. Further studies on testicular lipids and glycogen in human patients with unilateral varicocele. *Andrologia* 1984; 16: 442-5.
167. Sheriff DS. The lipid composition of human testis in patients with bilateral varicocele as cause of infertility. *Andrologia* 1982; 14:150-3.