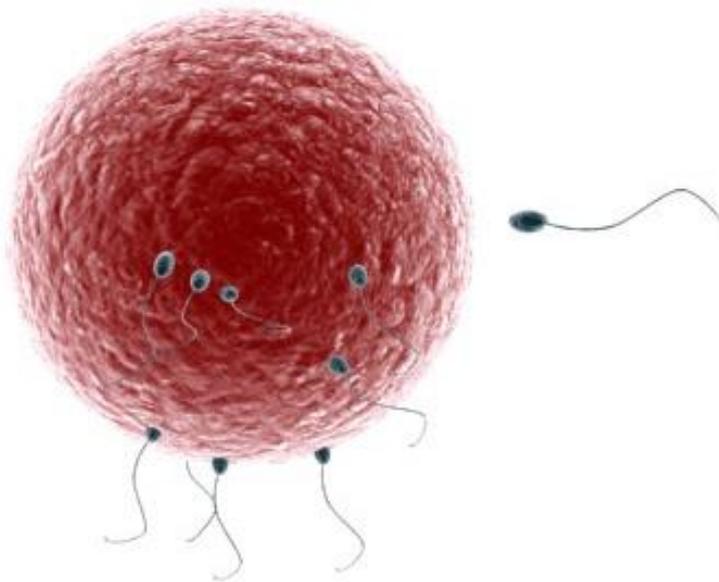


REVISIÓN SISTEMÁTICA SOBRE LA ASOCIACIÓN ENTRE LA LONGITUD TELOMÉRICA (LT) Y LA CALIDAD ESPERMÁTICA

Iñigo Arriazu Garcia

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor académico:

Pablo Hernández Alonso, PhD, (i) Bioquímica y Biotecnología (URV), (ii) Open Evidence S.L., pablo.hernandez@urv.cat, pfernandez@open-evidence.com

Tutor externo:

Silvia Canudas Puig, PhD, Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, Universidad de Barcelona, silvia.canudas@ub.edu

Data de convocatoria: septiembre 2021.

Jo, *Iñigo Arriazu Garcia*, amb DNI 78759633-C, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guiaper a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 31 de agosto de 2021

(signatura)

Esta tesis se ha realizado basada en el trabajo de prácticas llevado a cabo en la Unidad de Nutrición Humana del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV.

El desarrollo de la tesis se enmarca en la investigación sobre la Fertilidad Humana, concretamente del estudio LED-FERTYL, bajo la guía y supervisión del investigador Dr. Pablo Hernández Alonso y la investigadora Dra. Silvia Canudas Puig.



ÍNDICE

1.	ABREVIACIONES	9
2.	Resumen	10
3.	Introducción.....	12
3.1.	FERTILIDAD.....	12
3.1.1.	LA INFERTILIDAD EN LA POBLACION.....	12
3.1.1.	PROCESO FERTILIZACION	14
3.1.2.	REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	15
3.2.	TELOMEROS en el contexto de FERTILIDAD masculina	16
3.2.1.	¿QUÉ SON LOS TELOMEROS?.....	16
3.2.2.	COMPLEJO SHELTERIN	18
3.2.3.	ACORTAMIENTO DE LOS TELOMEROS	19
3.2.4.	TELOMERASA.....	20
3.2.5.	Telomeric repeat-containing RNA (TERRA).....	22
3.2.6.	FUNCIONES DE LOS TELOMEROS.....	22
3.2.7.	TELOMEROS EN CELULAS GERMINALES	24
4.	OBJETIVOS.....	26
5.	MATERIALES Y METODOS.....	27
5.1.	SELECCIÓN CRITERIOS DE BUSQUEDA	27
5.2.	ELIGIBILIDAD Y cRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	28
5.3.	CALIDAD DE LOS artículos ANALIZADOS	29
5.4.	Síntesis de los datos, PROFORMA	29
5.5.	análisis estadísticos	29
5.6.	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA el análisis de la LT	31
6.	RESULTADOS	32
6.1.	Relación entre LTE Y ERO	37
6.2.	RELACIÓN entre LTE Y FERTILIDAD.....	37
6.3.	RELACIÓN ENTRE LTE Y LA EDAD.....	38
6.4.	RELACIÓN de la LTE Y PARAMETROS de calidad espermática.....	39
6.5.	RELACIÓN entre la LTE Y la VIABILIDAD EMBRIONARIA	40
6.6.	RELACIÓN entre la LT y la EDAD DE Los progenitores EN EL MOMENTO DE LA CONCEPCION	41
7.	DISCUSIÓN.....	43
7.1.	JUSTIFICACION de los VALORES OBTENIDOS	43
7.1.1.	RELACIÓN ENTRE LTE Y ERO.....	43
7.1.2.	RELACIÓN ENTRE LTE Y PARAMETROS DE CALIDAD ESPERMATICA.....	44
7.1.3.	RELACIÓN ENTRE LTE Y VIABILIDAD EMBRIONARIA	44
7.1.4.	RELACIÓN ENTRE LA LTE Y LA EDAD DE LOS PROGENITORES EN EL MOMENTO DE LA CONCEPCION:	45
7.2.	HIPOTESIS DEL alargamiento de los telomeros y fertilidad.....	45

8.	CONCLUSIONES.....	47
9.	AUTOEVALUACIÓN.....	48
10.	Agradecimientos Personales.....	49
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
12.	ANEXOS.....	57
12.1.	ANEXO 1: Consulta realizada en las bases de datos.....	57
12.2.	ANEXO 2: CLASIFICACION DE LOS ARTICULOS.....	60
12.3.	ANEXO 3: PARAMETROS DE CALIDAD.....	61

1. ABREVIACIONES

AZ	Azoospermia
CS	Correlación significativa
DGC	Centrifugación en Gradiente diferencial
EPC	Edad paterna en la concepción
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FIV	Fecundación in vitro
IFD	Índice de fragmentación del ADN espermático
IICE	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
LT	Longitud de los telómeros / longitud telomérica
LTE	Longitud telomérica de los espermatozoides
LTL	Longitud telomérica de los Leucocitos
MA	Metaanálisis
NZ	Normozoospermia
OMS	Organización Mundial de la Salud (OMS)
OZ	Oligozoospermia
PIRE	Pérdida idiopática recurrente del embarazo
Q-FISH	<i>quantitative Fluorescent in situ hybridization</i>
Q-PCR	<i>real time Poyimerase Chain Reaction</i>
rp	Correlación de Pearson (rp)
rs	Correlación de rango de Spearman (rs)
RS	revisión sistemática

2. Resumen

Antecedentes: La salud reproductiva masculina disminuye año tras año. Factores ambientales y el estilo de vida como la contaminación, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la falta de actividad física, el estrés y las dietas poco saludables, son factores que impactan de manera negativa en la fertilidad. El acortamiento acelerado de los telómeros impacta en el envejecimiento celular y se ha asociado a varias enfermedades relacionadas con la edad, así como en la esperanza de vida. No obstante, la relación entre la longitud telomérica de los espermatozoides (LTE) y la fertilidad masculina no se conoce con exactitud.

Objetivo: Este trabajo consiste en una revisión sistemática sobre la asociación entre la LTE y la fertilidad masculina. El objetivo principal de este trabajo es resumir los diferentes estudios publicados investigando la asociación potencial de la calidad del esperma y la LTE. Además, se analizarán los posibles mecanismos que expliquen la asociación entre los determinantes del estilo de vida/ambiental y parámetros del seminograma, y la LTE. Para ello se recogerá toda la información publicada sobre la LTE y fertilidad para dar una visión holística y valorar los diferentes factores ambientales y de estilo de vida que afectan a la LTE que proporcione información útil sobre cómo pueden incrementarse las ratios de fertilidad en un futuro.

Materiales y métodos: Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura publicada en las bases de datos MEDLINE-PubMed y Cochrane hasta el 15 de marzo de 2021. Tres revisores trabajando de forma independiente revisaron todos los títulos, y posteriormente utilizando Abstrackr se realizó una clasificación inicial de todos los artículos para identificar los artículos que se incluían en los criterios de búsqueda. Se seleccionaron un total de 28 artículos que evaluaban la asociación entre la LTE y fertilidad masculina. Posteriormente se compararon los artículos filtrados y se realizó la proforma. Por último, se emplearon los resultados obtenidos para la extracción de los resultados.

Resultados y discusión: Los resultados de la revisión sistemática indica que una mayor LTE está asociada con una alta calidad de los parámetros del semen (concentración de espermatozoides, motilidad y morfología). Además, la LTE se correlaciona positivamente con la edad paterna en el momento de la concepción y con la viabilidad embrionaria. Nuestros resultados confirman que, la LTE está correlacionada negativamente con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) indicando uno de los posibles mecanismos.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que mantener una longitud de los telómeros óptima es importante para incrementar la calidad del esperma y aumentar el potencial de la fertilidad masculina. Así pues, la LTE puede ser un biomarcador para determinar la fertilidad humana.

Palabras clave: longitud telomérica, Humanos, hombre, fertilidad, revisión sistemática.

3. Introducción

Este trabajo se basa en el estudio LED-FERTYL (*Lifestyle and environmental determinants of seminogram and other male fertility related parameters*), estudio transversal de más de 200 participantes, llevado a cabo en la Unidad de Nutrición y dirigida por el Profesor Jordi Salas Salvadó del Departamento de Bioquímica (URV). Este estudio está enfocado en estudiar los parámetros determinantes de la calidad del esperma, como son la concentración, la motilidad, vitalidad de los espermatozoides y la longitud telomérica (LT), biomarcador del envejecimiento celular. Durante mis practicas curriculares he participado en el reclutamiento de los participantes y en el análisis del seminograma. Por este motivo se ha propuesto realizar una revisión sistemática sobre la asociación entre la LT y la fertilidad masculina.

Los telómeros son unas estructuras especiales situadas al final de los cromosomas que protegen la integridad del genoma y están asociados al envejecimiento celular, el cáncer o la fertilidad. Durante la división celular, la LT se acorta de forma natural debido al problema de replicación terminal hasta que se alcanza un tamaño crítico, causando senescencia celular o apoptosis afectando a la funcionalidad de los tejidos (Liu et al., 2002). La relación entre la LT la fertilidad masculina no se conoce con exactitud. Se ha propuesto la longitud de los telómeros de las células espermáticas, como un posible biomarcador de la calidad del semen, ya que la LT se asocia a parámetros alterados del esperma, a un incremento de la fragmentación del ADN, a una pobre calidad del embrión y afectando a la fertilidad (Biron-Shental et al., 2018).

Durante los últimos años, los telómeros han sido el foco de investigación de numerosos estudios, lo que ha permitido descubrir nuevas funciones hasta hace poco desconocidas, como la interacción con la membrana nuclear, la respuesta a estímulos del pronúcleo en la formación del embrión y se han asociado con un gran número de enfermedades degenerativas y relacionadas con la edad. Además, recientemente los telómeros se han sugerido como un nuevo indicador de la fertilidad humana. Si la LT se pudiera emplear como un indicador de fertilidad fiable, se aceleraría de forma significativa la diagnosis de la infertilidad en un grupo de pacientes cada vez mayor.

3.1. FERTILIDAD

3.1.1. LA INFERTILIDAD EN LA POBLACION

Para definir la infertilidad tomaremos la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que la define como “*aquella situación referida a la pareja en la cual no sobreviene un embarazo tras un año sin la utilización de sistemas anticonceptivos*”.

Se calcula que a nivel mundial la infertilidad afecta al 10-15% de las parejas. Actualmente la infertilidad se distribuye de la siguiente manera: en el 50% de los casos se deben a factores femeninos, el 20-30% a factores masculinos y el 20-30% a una combinación de factores mixtos. Como resultado, en al menos el 50% de los casos el factor masculino presenta algún grado de infertilidad (Cram et al., 2001; Ghorbani-Sini et al., 2020; Lafuente et al., 2018; Lopes et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que la integridad del ADN de los espermatozoides, el genoma mitocondrial, la expresión génica y la longitud de los telómeros de los espermatozoides, junto con la interacción de más de 2000 genes y la interacción del entorno genético, son los factores clave en la infertilidad masculina. (Mishra et al., 2016; Reig-Viader et al., 2014)

La infertilidad masculina es un problema de salud con etiología multifactorial, que incluye una influencia genética, ambiental y del estilo de vida. Sin embargo, la infertilidad sigue sin diagnosticarse correctamente en un gran porcentaje de hombres (Lopes et al., 2020). El primer paso para el diagnóstico de la infertilidad es la evaluación de parámetros cuantitativos y cualitativos en muestras de semen como concentración, morfología, vitalidad y motilidad (Cao et al., 2011). Sin embargo, estos parámetros no miden factores como la calidad de los espermatozoides, la integridad del genoma, las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la longitud de los telómeros que pueden tener un papel fundamental (Darmishonnejad et al., 2020).

En ocasiones al omitirse estos factores en el análisis, una gran proporción de hombres infértiles no reciben un diagnóstico claro y por lo tanto se acaba clasificando a esta parte de la población masculina como idiopáticos. Este hecho es particularmente evidente en casos de infertilidad o fallos repetidos en la reproducción asistida en los que se han analizado los parámetros seminales normales según las mediciones de referencia OMS (Cao et al., 2011). Incluso entre los embarazos clínicamente reconocidos, se estima que la incidencia de abortos espontáneos está entre el 10 y el 20% (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013), por lo que la fecundación no garantiza la fertilidad de los individuos.

Para aumentar la ratio de fertilidad, se ha comprobado que los cambios en los patrones dietéticos y hábitos diarios pueden resultar en un incremento notable en los índices de calidad de los parámetros seminales normales, con lo que se consigue incrementar la ratio de fecundación. (Berneau et al., 2020; Freitas-Simoes et al., 2016).

Pese a este incremento, incluso en los casos en los que se logra la fecundación, puede haber problemas posteriores en el desarrollo correcto del embrión, llegando incluso a pérdidas del embarazo. Entre las parejas que han intentado tener un embarazo, se estima que al menos un 1-3%

han sufrido una pérdida idiopática recurrente del embarazo (PIRE) lo que equivale al menos tres pérdidas consecutivas del embarazo antes de las 20-24 semanas de gestación (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013).

En la situación actual, se han detectado numerosos factores como defectos anatómicos, endocrinológicos, inmunológicos y genéticos que pueden conducir a la pérdida del embarazo, pero la causa exacta es desconocida y en casos de pérdidas recurrentes se incluyen estos casos como PIRE y no se obtiene un diagnóstico claro que permita determinar el motivo de dicha pérdida (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013).

3.1.1. PROCESO FERTILIZACION

La fertilidad, en contraposición con la infertilidad citada anteriormente, es la capacidad de un individuo de generar descendencia. Para que un individuo sea fértil tiene que ser capaz de completar con éxito un número de procesos, entre ellos la creación abundante de gametos con capacidad reproductiva. Por lo tanto, un individuo es fértil como resultado de la interacción de varios factores, como la edad, el estado de salud, el funcionamiento del sistema endocrino entre otros.

Durante el proceso de fertilización se ven involucrados una gran cantidad de genes, proteínas y vías de regulación que pueden ser determinantes a la hora de clasificar a individuos como fértiles. En la reproducción humana intervienen varios procesos, como la formación y el transporte de gametos, la fecundación, la implantación del embrión y el desarrollo del embrión en el útero. Es necesario que una persona pueda completar correctamente cada una de las etapas para que se le considere fértil (Reig-Viader et al., 2014).

La meiosis masculina y femenina difieren en muchos aspectos, entre ellos se incluyen la gametogénesis, la sincronía hormonal, la producción de gametos, los periodos de detención del ciclo, la morfología y la regulación (Reig-Viader et al., 2014). El proceso de selección masculino es más restrictivo que el femenino debido a que los puntos de control de los espermatozoides son especialmente críticos, ya que en caso de que no se cumplan correctamente todos los puntos de control meióticos, la gametogénesis masculina resulta en apoptosis y causa infertilidad debido a la reducción del número de espermatozoides maduros (Reig-Viader et al., 2014). Este crítico proceso de selección da como resultado una menor incidencia de aneuploidías en los espermatozoides en comparación con los ovocitos (Reig-Viader et al., 2014).

Además, hay que tener en cuenta otros factores previos, como la recombinación, también pueden ser críticos. Dado que la recombinación es necesaria para la correcta segregación de cromosomas

homólogos durante la meiosis, alteraciones en los factores relacionados con la recombinación homóloga pueden ser elementos que afecten a la fertilidad (Reig-Viader et al., 2014).

En los últimos años, para aumentar la ratio de fertilidad se han incluido nuevos indicadores complementarios que puedan ayudar a determinar la fertilidad de los varones humanos. Factores como el aumento de la temperatura testicular, el daño en el ADN o una menor LT pueden ser indicadores de baja fertilidad. Muchos de estos factores provienen del análisis de enfermedades asociadas a la fertilidad (Tahamtan et al., 2019).

3.1.2. REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La reproducción asistida son un conjunto de técnicas destinadas a favorecer el embarazo en casos de problemas de infertilidad masculina o femenina. Para una selección óptima de la técnica a realizar es necesario determinar el grado de fertilidad de las personas involucradas, generalmente de forma repetida y en diferentes momentos temporales. Posteriormente se realiza un análisis de los resultados y se propone un procedimiento específico a realizar. En este tipo de procedimientos se incluyen técnicas como la fecundación in vitro (FIV), la inseminación artificial y la ovodonación. En ocasiones el resultado de la reproducción asistida no concluye en un embarazo viable y es necesario repetir el procedimiento.

Entre los principales indicadores de fertilidad masculinos que se incluyen en clínicas de reproducción asistida se encuentran la concentración espermática, motilidad (progresiva, no progresiva y no motilidad), vitalidad de los espermatozoides y morfología. Según los criterios establecidos por la OMS, en función de los parámetros anteriores se suelen clasificar a los varones en las siguientes categorías asociadas a la fertilidad:

- Azoospermia (AZ) cero espermatozoides en el eyaculado
- Oligozoospermia (OZ) menos de 15 millones por ml de eyaculado
- Normozoospermia (NZ) ningún parámetro seminal alterado. La muestra seminal está dentro de la normalidad (15 millones por ml).

En ocasiones los indicadores anteriores no son suficientes para clasificar y determinar la causa de infertilidad del paciente y se diagnostica como idiopático. Para aumentar las ratios de fertilidad se han incluido factores encontrados en enfermedades asociadas a la fertilidad y se ha tratado de valorar su impacto. Entre los factores asociados a enfermedades relacionadas con la fertilidad masculina se incluyen una reducción de la LT o del daño en el ADN de los espermatozoides. Se ha comprobado que los factores citados anteriormente pueden provocar un fracaso de la fecundación, desarrollo embrionario anormal y la pérdida temprana del embarazo (Zhao et al., 2016). Incluso en

los casos en los que se han usado técnicas como la inseminación intrauterina, la fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) no se ha conseguido un buen desarrollo o implantación del embrión (Zhao et al., 2016). Por lo tanto, para solventar estos problemas es necesario determinar el grado de implicación de cada uno de los factores asociados a la fertilidad masculina.

Las técnicas usadas en las clínicas de reproducción asistida van orientadas principalmente a mejorar la calidad seminal de los parámetros clásicos. Algunos de los métodos empleados consiguen seleccionar poblaciones espermáticas con una mayor LT y con menor daño causado ERO. Ejemplos de estos métodos son la centrifugación en gradiente diferencial (DGC), por sus siglas en inglés “*density gradient centrifugation*” o el método conocido como *swim-up*. Ambos métodos se agrupan dentro de las técnicas de selección de espermatozoides, cuyo propósito principal es el aislamiento de una subpoblación móvil que presenta una mejor morfología e integridad del ADN. Por ejemplo, la selección *swim-up* se basa principalmente en la motilidad progresiva intrínseca de los espermatozoides a la hora de seleccionar una subpoblación mientras que la técnica de selección de la DGC se basa tanto en la densidad del espermatozoide como en su motilidad progresiva. (Lafuente et al., 2018).

Los resultados de estudios sugieren que no existen grandes diferencias en la LT antes y después de la selección de los espermatozoides mediante un método u otro (Lafuente et al., 2018; Santiso et al., 2010b; Yang, Zhang, et al., 2015). Ambos métodos consiguen una separación de poblaciones espermáticas de muy alta calidad en comparación con las muestras iniciales. Entre los estudios analizados sugieren que se puede alcanzar una mayor calidad del esperma extraído combinando ambos métodos (Lopes et al., 2020).

3.2. TELOMEROS EN EL CONTEXTO DE FERTILIDAD MASCULINA

3.2.1. ¿QUÉ SON LOS TELOMEROS?

Los telómeros son estructuras de cromatina que están ubicadas en los extremos de los cromosomas eucariotas. En los seres humanos, la composición del ADN de los telómeros consiste en aproximadamente 5-15 kb de nucleótidos repetidos en una secuencia dúplex rica en G de la forma 5'-TTAGGG-3'. Los telómeros son secuencias no codificantes, que terminan en un voladizo de una sola hebra. En los mamíferos estas secuencias se encuentran evolutivamente conservadas y son importantes para prevenir la degradación de los extremos de los cromosomas y mantener la integridad genómica (Moyzis et al., 1988; Samassekou et al., 2010; Thilagavathi, Venkatesh, et al., 2013).

La longitud de los telómeros varía entre las distintas especies, desde aproximadamente los 300 pb en la levadura a la decena de miles de bases en el ser humano, y sobre las 50 Kb en el ratón (Heidary et al., 2018).

Debido al problema de replicación terminal, en las células somáticas normales, los telómeros sufren un acortamiento progresivo con cada división mitótica perdiendo desde 50 hasta 200 pares de bases (pb) (Lafuente et al., 2018). A esta pérdida se le llama tasa de acortamiento. La tasa de acortamiento de los telómeros es diferente en cada célula, siendo menor en las células con una elevada tasa de proliferación (O'Sullivan & Karlseder, 2010; Thilagavathi, Kumar, et al., 2013; Yang et al., 2018).

En los humanos en particular, se ha observado una gran variación de la LT tanto entre individuos como en diferentes tejidos del mismo individuo (Yang et al., 2018). La LT es considerado un biomarcador del envejecimiento celular y viene determinada por varios factores tanto genéticos, como ambientales y estilo de vida (Darmishonnejad et al., 2020). Entre los factores se incluyen el estrés oxidativo, la edad paterna en el momento de la concepción, el tabaquismo, la dieta, la obesidad, el nivel socioeconómico, las infecciones padecidas y el estrés psicológico (Darmishonnejad et al., 2020; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013; Thilagavathi, Venkatesh, et al., 2013).

Al acumular un determinado número de divisiones celulares repetitivas los telómeros pueden llegar a una longitud demasiado pequeña llamada longitud mínima crítica. La longitud mínima crítica es variable entre especies y al alcanzarla, la estabilidad cromosómica, la integridad del genoma y la división celular se ven afectadas. Como consecuencia de este acortamiento telomérico, los telómeros quedan desprotegidos y aumenta el daño en el ADN, dando a lugar a senescencia replicativa, detención del ciclo celular y / o apoptosis celular (Blackburn et al., 2006; Cariati et al., 2016; Ferlin et al., 2013; Harley B. et al., 1990; Liu et al., 2002; Torra-Massana et al., 2018; Turner & Hartshorne, 2013; Yang, Zhao, et al., 2015). Por lo tanto, el tamaño de los telómeros limita el potencial replicativo y la vida útil de las células somáticas (Santiso et al., 2010b).

Este acortamiento telomérico puede afectar a las estructuras cromosómicas, que resulta en una pérdida de funcionalidad por falta de recubrimiento en sus extremos, lo que da como resultado translocaciones no recíprocas, donde el cromosoma dañado tiene el potencial de convertirse en un cromosoma fusogénico que unirá los telómeros de dos cromosomas diferentes desprotegidos provocando problemas de inestabilidad en el genoma, reordenamientos, deleciones, aneuploidías y daño en el ADN en general (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013).

Además, se ha indicado que el acortamiento de los telómeros desempeña un papel importante en el envejecimiento. La longitud de los telómeros se ha usado para determinar la edad celular o edad

biológica de los individuos a diferencia de la edad cronológica. De hecho una menor longitud de los telómeros de los leucocitos (LTL) se ha asociado con la edad cronológica y con un aumento en las enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Heidary et al., 2018; Yang et al., 2018).

3.2.2. COMPLEJO SHELTERIN

El complejo shelterin, es un complejo proteico compuesto por seis proteínas que se une a los telómeros para realizar dos funciones principales, mantenimiento de la longitud de los telómeros y protección telomérica, ya que impide el reconocimiento de los extremos de los cromosomas como roturas de la doble cadena de ADN (Titia De Lange, 2005; Lafuente et al., 2018). La activación de respuesta al daño al ADN puede derivar en uniones indeseadas, senescencia y errores en el genoma.

Dentro del complejo shelterin, tres de las seis proteínas (TRF1, TRF2 y POT1) se unen de manera específica a la secuencia telomérica siendo específicas de los telómeros. En cambio, las proteínas TIN2 y TPP1 tienen la función de actuar como plataforma para enlazar POT1 con TRF1 y TRF2. Una característica de la estructura de los telómeros es la presencia de una hebra en forma cadena sencilla en el extremo 3'.

Con esta hebra se articula un lazo telomérico, llamado *t-loop*. El *t-loop* se forma debido al plegamiento del ADN telomérico de una sola hebra otorgando una mayor protección. El complejo shelterin cubre la mayor parte de la región telomérica bicatenaria y POT1 cubre el ADN telomérico monocatenario en el saliente 3'.

Al final del *t-loop*, el ADN telomérico de una sola hebra se entrelaza con una región de ADN doble cadena dando lugar a una estructura de triple hebra denominada *d-loop*. Varias proteínas y nucleosomas asociados, junto con el complejo CST también participan en las funciones de protección y regulación del ADN (T de Lange et al., 1990; Mishra et al., 2016). En los últimos años se ha descrito que los telómeros transcriben unas largas moléculas de RNA llamadas TERRA (*TElomeric Repeat containing RNA*) cuya función es esencial para el mantenimiento de estas estructuras protectoras.

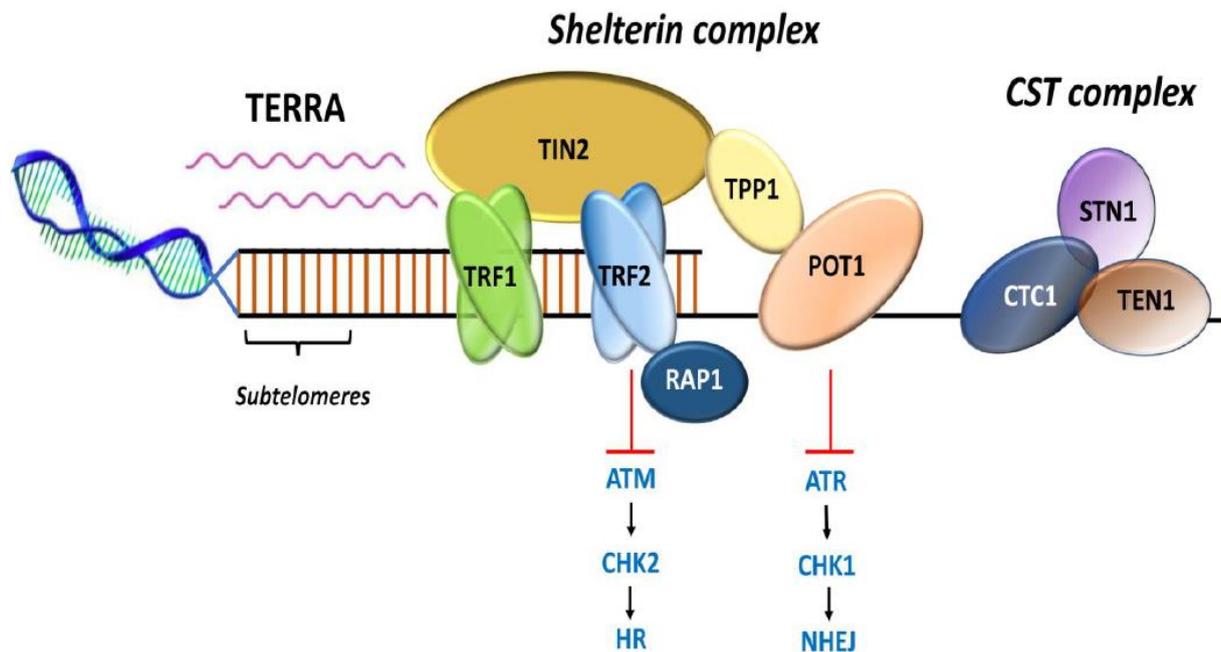


Figura 1. Obtenido de: Srinivas et al. (2020). Representación del complejo Shelterin, del complejo heterotrimérico CST y TERRA. El complejo Shelterin está compuesto por las subunidades proteicas TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 y RAP1. El complejo CST está compuesto por las subunidades proteicas STN1, CTC1 y TEN1. Además, un *Long non-coding RNA* denominado TERRA actúa como regulador negativo de la actividad de la telomerasa.

3.2.3. ACORTAMIENTO DE LOS TELOMEROS

Entre las causas de acortamiento de los telómeros, además de la división celular normal, se incluyen el estrés oxidativo, las agresiones genotóxicas, la predisposición genética, malos hábitos de vida, dieta, aumento de la actividad inflamatoria, factores ambientales, el tabaquismo, la obesidad, el ejercicio intenso y la escasa actividad física (Berneau et al., 2020; Ferlin et al., 2013; Heidary et al., 2018; Santana et al., 2019; Thilagavathi, Venkatesh, et al., 2013; Yang, Zhang, et al., 2015).

Los telómeros son especialmente propensos al daño oxidativo, debido al alto contenido de guaninas que reaccionan fácilmente con compuestos oxidativos y pudiendo modificar la guanina a 8-oxo-guanina (8-OHdG) provocando una ruptura del ADN telomérico, que puede resultar en un daño a la integridad celular y genómica (Aitken & De Lullis, 2009; Coluzzi et al., 2014; Kim & Velando, 2015; Lafuente et al., 2018; Mishra et al., 2016; Rocca et al., 2016; Santiso et al., 2010a; Shravya Keerthi et al., 2015). Las roturas en las regiones teloméricas de una sola hebra son especialmente críticas, debido a que su reparación es menos eficaz que en el resto del genoma (Mishra et al., 2016) y los telómeros acaban sufriendo un acortamiento acelerado. Se ha podido comprobar que la presencia de altas concentraciones de ERO también pueden alterar la función del complejo shelterin,

incrementar el número de roturas en las cadenas de ADN e inducir la detención del ciclo celular a través de ATM/Chk1 (Darmishonnejad et al., 2019).

Este acortamiento también se puede producir en las células germinales, donde se ha podido comprobar que la disfunción mitocondrial (Liu et al., 2002), la acumulación de daños en el ADN no reparados (Harley B. et al., 1990; Turner & Hartshorne, 2013) o la pérdida de la actividad de la telomerasa en los testículos, puede hacer que los espermatozoides presenten mayor fragmentación del ADN y una reducción en la LT (Tahamtan et al., 2019).

Se ha comprobado que este acortamiento de las células germinales masculinas está relacionado con la alteración de la viabilidad embrionaria y desarrollo fetal causando segregación cromosómica errónea (aneuploidía) e inestabilidad (Baird et al., 2006; Biron-Shental et al., 2018; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013). Para evitar todos los problemas anteriores que pueden dar lugar a la muerte celular y mantener el correcto funcionamiento de los telómeros, algunas células expresan una enzima especializada en la reparación del daño telomérico. Esta enzima se denomina telomerasa y se encarga de añadir una secuencia de bases en los extremos cromosómicos para mantener la LT.

3.2.4. TELOMERASA

La telomerasa es una ADN polimerasa dependiente de ARN clasificada dentro de las transcriptasas inversas que puede alargar los extremos teloméricos añadiendo repeticiones de nucleótidos a los extremos del cromosoma. (Lafuente et al., 2018; Liu et al., 2002; Lu et al., 2011). Este alargamiento es fundamental, debido a que como se ha podido comprobar durante la replicación, la ADN polimerasa no tiene capacidad para completar la replicación de los extremo 3' de los cromosomas (Harley B. et al., 1990), dejando sin replicar entre 50 y 200 pb. La enorme relevancia en la biología moderna del descubrimiento de la estructura telomerasa y su actividad telomérica otorgó a las investigadoras Elizabeth Helen Blackburn y Carolyn Widney Greider junto a Jack W. Szostak el premio nobel de Medicina y Fisiología en 2009 por su descripción molecular de los telómeros y la identificación del enzima telomerasa (Greider & Blackburn, 1987).

La telomerasa humana está compuesta por dos subunidades, un componente funcional de ARN que funciona como plantilla para la síntesis del ADN telomérico (hTERC) y una proteína catalítica que actúa como una transcriptasa inversa (hTERT). Ambos componentes están regulados por una serie de proteínas y factores que modulan su expresión y funcionalidad (Blackburn, 1991; Santana et al., 2019; Thilagavathi, Venkatesh, et al., 2013). La telomerasa se encarga de sintetizar una secuencia de bases específica (en mamíferos (TTAGGG)_n) en los extremos cromosómicos para compensar la pérdida de información genética durante la replicación del ADN (Heidary et al., 2018).

La expresión de la hTERT está asociada a la actividad de la enzima (Biron-Shental et al., 2018; Reig-Viader et al., 2014). Además, se ha comprobado que la expresión de hTERT es menor en pacientes infértiles, lo que implica la asociación entre la expresión del componente TERT y la actividad de la enzima puede dificultar la fertilidad (Reig-Viader et al., 2014).

La telomerasa se encuentra silenciada en la mayoría de los tejidos somáticos humanos. Sin embargo, se expresa especialmente en algunos tipos de células altamente proliferativas, como las células germinales y neoplásicas (Blackburn, 1991; Cariati et al., 2016; Ferlin et al., 2013). La expresión de la telomerasa está altamente regulada y se puede modular dependiendo de diferentes factores como el estilo de vida. Un estudio realizado en la Unidad de Nutrición demostraron que una dieta rica en pistachos induce la expresión del TERT en individuos prediabéticos (Canudas et al., 2019).

Además, se ha observado su pérdida de expresión en espermatozoides u ovocitos maduros (Lafuente et al., 2018). Esta ausencia de expresión se debe a que la telomerasa se expresa principalmente en la fase S del ciclo celular y al completar la fase su expresión se reduce (Lu et al., 2011).

La telomerasa es crucial para mantener la LT durante la espermatogénesis en las células de la línea germinal. Posteriormente en el cigoto, la telomerasa se expresará de nuevo para mantener la LT en las sucesivas divisiones celulares. En caso de ausencia o pérdida de función de la telomerasa durante alguna de las etapas se podría ver limitada la capacidad de replicación de las células, lo que derivara en una limitación del crecimiento de masa celular interna del blastocisto (Baird et al., 2006; Biron-Shental et al., 2018; Lopes et al., 2020).

La telomerasa también puede actuar como componente estructural del complejo telomérico en células somáticas y germinales al asociarse a los telómeros, contribuyendo a la integridad de la estructura telomérica. Este hecho, junto con la reciente descripción de una asociación TERRA-telomerasa en células germinales de mamíferos destaca la importancia de la homeostasis de los telómeros en la fertilidad. (Reig-Viader et al., 2014)

Cuando los telómeros se acortan, tienen el potencial de crear cromosomas fusagénicos, translocaciones desequilibradas y microdeleciones terminales. Es decir, al acortarse los telómeros pueden quedar desprotegidos al no estar asociados a complejos proteicos que los envuelvan. Esta desprotección puede dar lugar a que ligasas unan las partes terminales de dos cromosomas distintos produciendo un efecto de "captura de telómeros". Este mecanismo está asociado a la anormalidad genómica de las células cancerosas. También se ha descrito en células expuestas a factores de

estrés metabólico, como la glucosa anormal o la hiperlipidemia, así como la hipoxia y las infecciones (Biron-Shental et al., 2018).

3.2.5. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA)

Junto con la telomerasa y el complejo shelterin, un “*long non-coding RNA*” transcrito de las regiones subteloméricas denominado TERRA (*Telomeric repeat-containing RNA*) ayuda a mantener la integridad genómica y la LT. Se ha comprobado que TERRA participa en el ciclo celular y aportando estabilidad a la estructura telomérica y se localiza en el núcleo de las células somáticas y germinales de los mamíferos, ya sea como moléculas libres o asociadas a la estructura telomérica. (Reig-Viader et al., 2014).

La localización de TERRA en los telómeros durante la meiosis de los mamíferos está relacionada con la regulación de su transcripción durante la espermatogénesis. Esto es crucial puesto que TERRA interacciona como un regulador negativo de la telomerasa (Reig-Viader et al., 2014), de forma que unos niveles altos de expresión de TERRA se asocian a una inhibición en la actividad de la telomerasa y por lo tanto resulta en telómeros más cortos y una baja expresión de TERRA se asocia a una mayor expresión de la telomerasa y a telómeros más largos. Esta hipótesis se basa en dos líneas de evidencia:

- La asociación de oligonucleótidos similares a TERRA con la subunidad TERC de la telomerasa, que actúa como molde, bloqueando la actividad replicativa de TERT.
- Correlación inversa entre los niveles de TERRA y la LT.

Aunque es necesario profundizar en el mecanismo de acción y la función de TERRA. Algunos estudios han demostrado que TERRA se encuentra en una alta proporción en los telómeros de las células somáticas y una disminución de los niveles de TERRA puede inducir una alteración de la distribución nuclear (Reig-Viader et al., 2014). TERRA está implicado en el mantenimiento de la integridad telomérica en las células germinales de mamíferos (Schoeftner & Blasco, 2008).

3.2.6. FUNCIONES DE LOS TELOMEROS

a) PREVENCIÓN DEL DAÑO CELULAR

Entre las funciones reconocidas de los telómeros se encuentra la de **prevención del daño celular**, debido a que se ha podido demostrar que los telómeros que no logran ocultar sus extremos desencadenan una respuesta de daño del ADN (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013), dando señales de activación la maquinaria de reparación de rotura de doble hebra, lo que lleva a una detención del ciclo celular **dependiente de p53** denominada senescencia replicativa (Baird et al., 2006), induciendo la apoptosis y dando como resultado una pérdida de células y a la disfunción de los tejidos (Heidary et al., 2018).

Por todo lo citado anteriormente los telómeros cumplen una función de preservación de la integridad de los cromosomas y del genoma (Heidary et al., 2018) protegiendo la zona terminal de la degradación (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013) y confirmando estabilidad al cromosoma (Ferlin et al., 2013). Al controlar estos factores se favorece la correcta proliferación celular y la supervivencia (Mishra et al., 2016).

b) MITOSIS Y MEIOSIS

Los telómeros también tienen un papel importante durante la **división celular**, los telómeros median el emparejamiento de cromosomas homólogos, coordinan la Interacción con la membrana nuclear y la colocación de los centrómeros, favorecen la sinapsis facilitando la recombinación homóloga y una segregación controlada de los cromosomas (Heidary et al., 2018; Thilagavathi, Kumar, et al., 2013; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013).

Además, el acortamiento de los telómeros puede generar una alteración del movimiento microtubular, localización cromosómica anormal y defectos de recombinación (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013), que pueden desencadenar errores meióticos provocados por la inestabilidad cromosómica (Blackburn, 1991; Blackburn et al., 2006; Cariati et al., 2016) que dan como resultado una mayor tasa de aneuploidía espermática que será transmitida al embrión (Antunes et al., 2015; Cariati et al., 2016; Lafuente et al., 2018; Liu et al., 2002; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013), limitación del desarrollo embrionario en etapas de mórula y blastocisto (Lafuente et al., 2018; Liu et al., 2002), pérdidas antes o después de la implantación y contribuir a una escisión anormal y un desarrollo deficiente (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013)

c) FECUNDACIÓN Y EMBARAZO

Tras la fecundación, los telómeros se encuentran entre las primeras estructuras del núcleo del espermatozoide que responden a las señales del ovocito para el desarrollo del pronúcleo masculino (Vecoli et al., 2017; Zalenskaya et al., 2000) y existe una correlación positiva entre la LTE y la calidad del embrión en la fase inicial (Siderakis & Tarsounas, 2007; Torra-Massana et al., 2018; Zhao et al., 2016).

Una LTE reducida y fragmentación del ADN espermático pueden dar lugar a una interacción anormal entre los telómeros, pérdida de la configuración de los cromosomas (Thilagavathi, Mishra, et al., 2013) que genera una mala segregación cromosómica en los embriones de reimplantación y gametos (Cariati et al., 2016), influyendo negativamente en la morfología del embrión, que puede resultar en un desarrollo embrionario anormal (Siderakis & Tarsounas, 2007; Zhao et al., 2016) e incluso a la

pérdida del embarazo debido a abortos espontáneos repetidos (Cariati et al., 2016; Lafuente et al., 2018; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013)

3.2.7. TELOMEROS EN CELULAS GERMINALES

Los espermatozoides son células haploides altamente diferenciadas que surgen de un proceso de espermatogénesis. En los espermatozoides de los mamíferos, los telómeros están anclados a la membrana nuclear, donde forman dímeros y tetrámeros que desempeñan un papel fundamental en la organización del núcleo del esperma (Antunes et al., 2015).

La secuencia de telómeros humanos varía en longitud de 5 a 10 kb en células somáticas (Cariati et al., 2016; Kozik et al., 1998) y de 10 a 20 kb en células germinales (T de Lange et al., 1990; Mishra et al., 2016; Samassekou et al., 2010; Tahamtan et al., 2019; Thilagavathi, Kumar, et al., 2013). Entre estos datos existe una gran variabilidad inter e intraindividual en LTE, incluso entre poblaciones del mismo eyaculado (Kozik et al., 1998; Torra-Massana et al., 2018).

Carencia de acortamiento de LT con la edad, se debe a la alta expresión de TERT, en las células germinales (Ferlin et al., 2013; Zalenskaya et al., 2000) desde la etapa de espermatogonias a espermatozoides (Antunes et al., 2015; Darmishonnejad et al., 2020; Ferlin et al., 2013) y una atrición celular selectiva que conduce a la muerte de los proto espermatozoides con LT acortada produciendo una selección de un subconjunto de espermatozoides con telómeros más largos (Aston et al., 2012; Ferlin et al., 2013), lo que resulta ser de vital importancia dado que los espermatozoides están destinados a garantizar la transmisión de cromosomas intactos a lo largo de generaciones.

De hecho, varios estudios han informado que la edad de los padres en el momento de la concepción se correlaciona positivamente con el aumento de la LTE (Torra-Massana et al., 2018) e incluso en una mayor LTL de la descendencia (Aston et al., 2012; Ferlin et al., 2013).

Las proteínas de unión a telómeros, en las células germinales y en las células somáticas son diferentes. Esto es debido a que en los espermatozoides el empaquetamiento de la cromatina está muy condensada para la protección contra cualquier agresión química y física (Lafuente et al., 2018). En las células somáticas, la doble hebra de ADN se envuelve alrededor de las histonas y se organiza en nucleosomas que compactan alrededor de 200 pares de bases. En los espermatozoides, la mayor parte del ADN está empaquetado con protaminas (frente al 2-15% condensado por histonas) y organizado en toroides que compactan alrededor de 25-50 Kb de ADN (Aston et al., 2012; Lafuente et al., 2018). Esta diferencia en el empaquetado puede hacer más difícil el análisis de la LT y dificulta el reconocimiento del ADN de los telómeros (Cariati et al., 2016).

La organización cromosómica del núcleo espermático muestra que los telómeros y las regiones subteloméricas están localizadas en la periferia nuclear, organizados en dímeros o tetrámeros y unidos a la matriz nuclear (Kozik et al., 1998; Lafuente et al., 2018; Zalenskaya et al., 2000) Esta localización relacionada con la alineación, entrecruzamiento y separación en las fases previas de la meiosis.

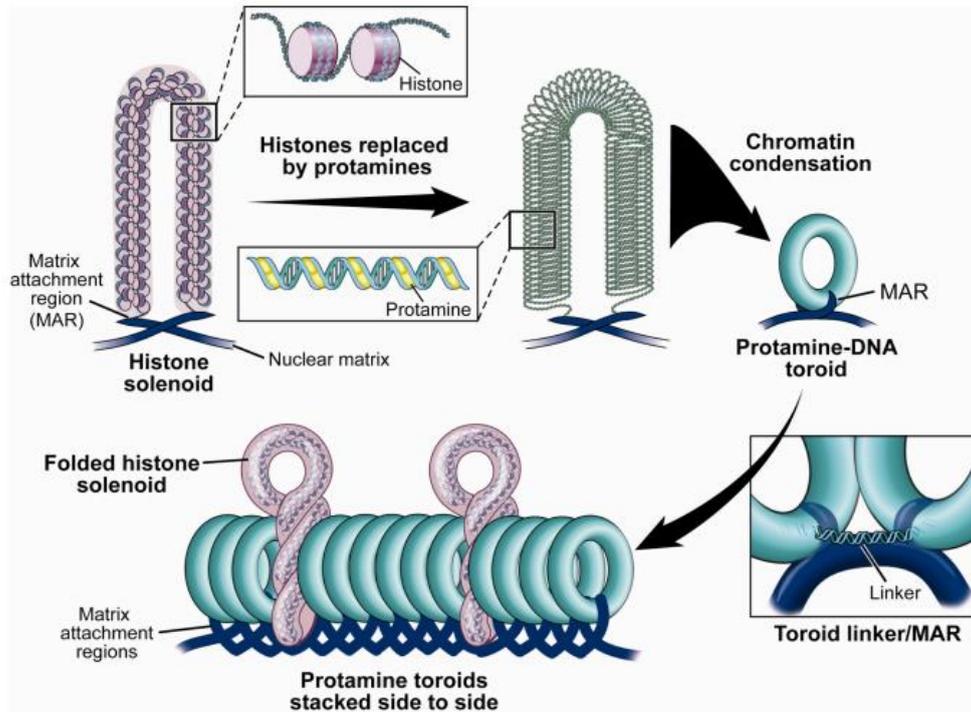


Figura 2. Obtenido de: Singh et al. (2011). Representación de la estructura de compactación del ADN en los espermatozoides organizada en toroides para maximizar la compactación del ADN y evitar la acción de enzimas.

La dinámica en la espermatogénesis, también esta mediada por los telómeros que migran hacia la membrana nuclear donde desde la transición del leptoteno al cigoteno, interactúan con el centro organizador de microtúbulos citoplasmáticos, formando lo que se conoce como el ramo (Ferlin et al., 2013). Con la formación de ramilletes, los telómeros realizan un emparejamiento cromosómico homólogo, lo que permite el correcto entrecruzamiento y una buena segregación cromosómica en la primera división meiótica (Cariati et al., 2016; Ferlin et al., 2013; Kozik et al., 1998; Yang, Zhang, et al., 2015)

Por tanto una LTE menor podría afectar la espermatogénesis a través de errores de segregación, apoptosis de las células germinales y reducción del recuento de espermatozoides (Ferlin et al., 2013; Siderakis & Tarsounas, 2007).

4. OBJETIVOS

En la actualidad, el desconocimiento de los factores involucrados en la infertilidad es un obstáculo para el desarrollo de nuevas técnicas incrementen la fertilidad masculina. La mayoría de las estrategias relacionadas con el incremento de la fertilidad se centran en alterar hábitos alimenticios, reducir el sedentarismo, así como el uso de técnicas que faciliten la disminución del estrés y técnicas de selección de espermatozoides como el DGC o *swim-up*.

Los parámetros tradicionales de clasificación espermática no resuelven casos de varones humanos infértiles incapaces de tener hijos y clasificados como idiopáticos. Factores ambientales, el estilo de vida especialmente la dieta impactan en la longitud de los telómeros afectando a la salud celular, así como a los espermatozoides. Así pues, el efecto de la LT se puede emplear como un nuevo indicador de fertilidad, ya que factores como la fragmentación de DNA, el estrés o ERO acaban reduciendo la LTE y por lo tanto afectando a la fertilidad de los varones.

En consecuencia, la **hipótesis** de este trabajo final de grado (TFG) es que *una mayor LT – o un menor acortamiento de los telómeros en términos relativos- está asociada con una mayor calidad espermática, que puede traducirse en una mayor ratio de fertilidad.*

En consecuencia, nuestro OBJETIVO GENERAL ha sido:

- Realizar una revisión sistemática (RS) y metaanálisis (MA) para analizar la asociación entre la LT de los espermatozoides - u otras células como los leucocitos - y la calidad espermática.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Proporcionar un listado de todos los factores asociados con el acortamiento, mantenimiento o alargamiento de la LT y su nivel de implicación en dichas modificaciones.
2. Detectar posibles deficiencias en la recolección de datos entre los diferentes estudios y establecer parámetros comunes en el global de los artículos seleccionados para mejorar la información disponible actualmente.

5. MATERIALES Y METODOS

Segun Cochrane una revisión sistemática es "*un proceso científico en el que se cotejan todas las pruebas empíricas que se ajustan a unos criterios de elegibilidad previamente especificados con el fin de responder a una pregunta de investigación específica*". Consiste en la búsqueda, selección, síntesis y valoración sistemática de diferentes estudios de investigación con el fin de tener una visión amplia de elevada calidad sobre un tema, respondiendo a una pregunta de investigación previamente especificada. En nuestro estudio nos centraremos en determinar cómo afecta la LT a la fertilidad de individuos varones.

5.1. SELECCIÓN CRITERIOS DE BUSQUEDA

Para la definición de los términos de búsqueda (Anexo 1), se contó con dos expertos en las áreas del TFG presente. La Dra. Silvia Canudas – cotutora del TFG –, experta en biología molecular en los ejes LT, alimentación y cáncer con publicaciones como (Mazzolini et al., 2018) o (Canudas et al., 2019); y el Dr. Albert Salas Huetos, experto en biología molecular de la fertilidad masculina. Ambos, con un amplio *expertise* en revisiones sistemáticas y metaanálisis como por ejemplo (Salas-Huetos et al., 2021).

Para realizar la revisión sistemática se siguieron las líneas guía del Manual Cochrane de Revisiones Sistemáticas (Cochrane Handbook of Systematic Reviews). Para ello realizamos una revisión sistemática de la literatura publicada utilizando los datos extraídos de la base de datos PubMed y Cochrane para determinar la influencia de la LT en la calidad espermática de varones humanos. Toda la búsqueda se centró en publicaciones científicas escritas en inglés que cumplieran los criterios de inclusión. Tras ejecutar diferentes búsquedas se estableció una consulta que contuviera los valores de interés para el estudio y los resultados obtenidos fueron guardados, y después de eliminar duplicados entre bases de datos, se incluyeron en el programa Abstrackr (abstrackr.cebm.brown.edu).

Los artículos seleccionados fueron artículos publicados hasta la fecha del 15 de marzo de 2021. De la muestra inicial de artículos (1600) se seleccionaron mediante términos de búsqueda más específicos 643, posteriormente se excluyó los artículos que no cumplieran los criterios de inclusión seleccionando 28 artículos sobre los que se realizaría la revisión sistemática (26 de marzo de 2021).

** Los términos incluidos en el criterio de búsqueda realizada en ambas bases de datos se encuentran en el Anexo 1.

5.2. ELIGIBILIDAD Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para facilitar la clasificación se usó la herramienta Abstrackr (abstrackr.cebm.brown.edu), mediante la cual tres investigadores independientes realizaron el cribado, sin la posibilidad de puesta en común de sus respectivas clasificaciones para evitar al máximo cualquier influencia entre ellos.

Al acabar el filtrado inicial, se comparan los resultados del filtrado inicial y en caso de desacuerdo y/o errores un tercer investigador participa en solventar el conflicto. Debido a la heterogeneidad de los artículos se estableció una tabla de clasificación. Por lo tanto, los artículos sobre los que se basa la revisión sistemática son aquellos que cumplen criterios de búsqueda y que no han sido descartados por ninguno de los criterios establecidos de inclusión determinados en la Tabla 1.

Durante la clasificación se asignó una etiqueta de clasificación a cada artículo para identificar los motivos por los que ha sido descartado y facilitar la posterior revisión en caso de conflicto. Los artículos descartados no se incluyeron entre los seleccionados para realizar la proforma (i.e., documento Excel donde se detalla la información de cada publicación, Anexo 2), de esta manera quedan clasificados únicamente por la etiqueta asignada.

LETTER CODE	DEFINITION
A	Animal
IV	In vitro study
ABS	Abstract, proceedings, symposium presentations, invited lectures
E	Especial articles
L/C/V/S	Letter, commentaries, viewpoints, summaries for patients, editorials, opinion articles
R	Review, meta-analysis
G	Guidelines or scientific statements
D	Design: ecological, retrospective cohorts, methodological descriptions, case report
NTL	Not assessing TL
NE	Non-endpoint (not related with sperm quality or fertility)
PASS	Pass to the next step

Tabla 1. Muestra de los criterios empleados para la selección de artículos. El orden de prioridad establecido es el siguiente: A, IV, ABS, E, L/C/V/S, R, G, D, NTL, NE, PASS.

Los artículos que se esperan seleccionar han de pertenecer a alguna de las siguientes categorías:

- Prospectivos (i.e., cómo niveles basales de LT predicen fertilidad en el futuro)
- Transversales (i.e., cómo se asocian niveles de LT con fertilidad)
- Caso-control (i.e., cómo se asocia la fertilidad con una mayor o menor LT)

El uso de las restricciones permitió reducir el volumen de artículos y obtener información alineada con los objetivos de nuestro estudio. De hecho, de los 643 artículos iniciales se obtuvieron 30 artículos filtrados.

5.3. CALIDAD DE LOS ARTÍCULOS ANALIZADOS

Para realizar el análisis de la calidad de los artículos, se estableció una clasificación específica para cada tipo de artículo a evaluar (prospectivo, transversal o caso-control) usando la herramienta para Estudios de Cohortes Observacionales y Transversales “*the National Heart, Lung, and Blood Institute Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies*”. Esta herramienta permitió a los autores a calificar la calidad de los estudios como buenos, justos o deficientes según diferentes criterios (<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools>).

En cada una de las categorías asignadas se mide la calidad individual de cada artículo atendiendo a los criterios establecidos para la clasificación, determinados por la unidad (Anexo 3). En caso de que un artículo cumpliera con el valor de la categoría asignada se le asignaba un valor de 1, mientras que en caso contrario 0. El valor de cada artículo quedaba por tanto delimitado dentro de un rango. A mayor valor, mayor calidad de interés del artículo. Rangos máximos de cada tipo de artículo: (transversal ≤ 14 , prospectivos ≤ 9 y caso control ≤ 12).

5.4. SÍNTESIS DE LOS DATOS, PROFORMA

Tras el proceso de filtrado y clasificación de los 30 artículos se eliminaron 2 por criterios de idioma, por lo que se obtuvieron 28 artículos para analizar. Se descargaron y se leyeron cada uno de los 28 artículos. Los 28 artículos de interés fueron utilizados para cumplimentar la proforma. Durante este proceso se mantuvo a las dos personas encargadas de la lectura de artículos incomunicadas entre sí, con el objetivo de obtener una valoración lo más objetiva posible. De cada artículo se se realizó la síntesis de datos que consiste en describir los estudios incluidos en la revisión: el número de participantes, país de origen, fecha, métodos utilizados, declaración de intereses, seguimiento en el tiempo, fondos del artículo, tipos de muestras y análisis utilizados. Además, se incluye un campo propio a cada tipo de artículo para determinar la adecuación y validez del artículo a los intereses de la presente RS. Al acabar se ponen en común los resultados. En los casos en los que se encontraron incongruencias por parte de alguno de los miembros, una tercera persona fue la encargada de tomar la decisión correcta, basándose en todos los elementos extraídos. Cuando se realizaron todas las correcciones se procedió a la obtención de los resultados

En la figura 2 se muestra la información mediante un diagrama de flujo basado en los elementos de Información Preferidos para Revisiones Sistemáticas y Meta-Análisis (PRISMA) (Liberati et al., 2009).

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para realizar el análisis estadístico se realizó por el investigador Pablo Hernández en R. El objetivo de este análisis es evaluar el número de artículos obtenidos y las relaciones presentes entre ellos,

así como los métodos empleados y los resultados extraídos. La RS se realizó mediante la clasificación de los parámetros espermáticos determinados por la OMS en las categorías de pH > 7,1 valores inferiores podrían indicar disgenesia, Concentración \geq 15 millones de espermatozoides mL o 39 millones en toda la muestra (Oligozoospermia), Motilidad evalúa el porcentaje de espermatozoides inmóviles, móviles no progresivos y móviles progresivos que deben superar el 32% (astenozoospermia), vitalidad espermatozoides \geq 58% del total (necrozoospermia), morfología \geq 4% de espermatozoides normales (teratozoospermia). Así como los métodos por los que se ha obtenido el resultado *quantitative – real time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)* y *quantitative Fluorescent in situ hybridization (Q-FISH)*.

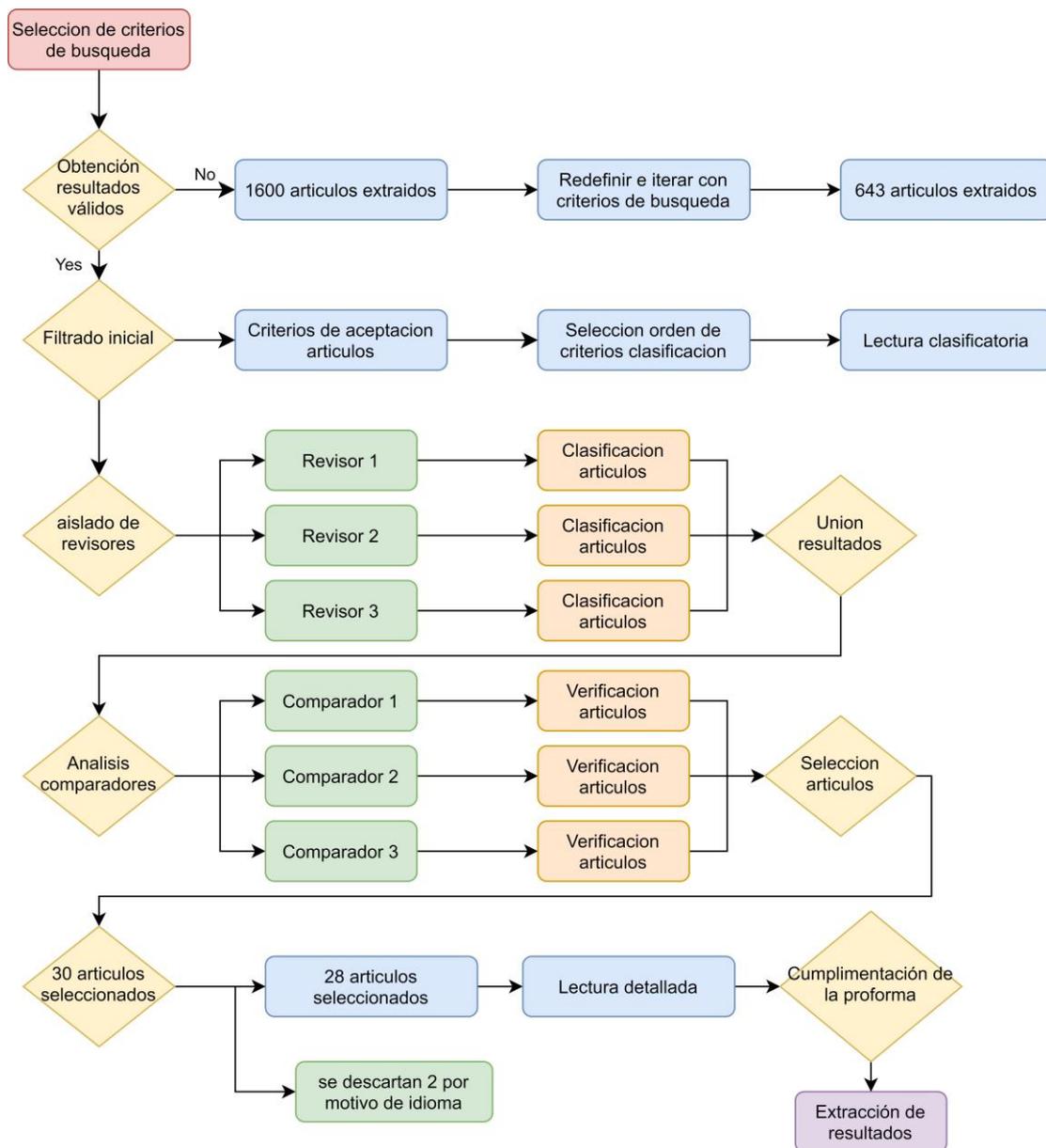


Figura 3. Diagrama flujo de trabajo. Representación de las etapas realizadas durante la Revisión sistemática.

5.6. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE LA LT

En los estudios analizados las técnicas utilizadas para las mediciones de LTE, han sido dos principalmente: Q-PCR y Q-FISH.

La ventaja del método Q-PCR es que refleja las diferencias en el LT media de diferentes muestras de células, requerimiento de pequeñas cantidades de ADN, es rápida, barata y ha sido adoptada por numerosos estudios para medir la LT relativa en diferentes tipos celulares. Pero este método presenta dos desventajas frente a la técnica Q-FISH:

- Proporciona una medición de la LT media en una población determinada de células, lo que no permite diferenciar los telómeros críticamente cortos o largos en la misma muestra.
- La LT medida por Q-PCR no es comparable entre estudios, debido a la variación entre ensayos y a las desviaciones introducidas por los diferentes métodos de extracción de ADN o la eficiencia de amplificación.

Por otro lado, técnicas como la Q-FISH o la citometría de flujo (FLOW- FISH) pueden considerarse métodos más apropiados para determinar la LT de los espermatozoides ya que permite analizar la LT a nivel celular detectando el % de telómeros cortos críticos para la viabilidad celular.

Así pues, mediante estos métodos sería interesante la creación de bases de datos de la LTE de manera que permitiría una comparación global entre diversos estudios y avanzar en conocimiento sobre el impacto de la LT en la fertilidad.

Debemos ser conscientes de que el uso de estas técnicas en espermatozoides conlleva una mayor dificultad debido a la alta condensación de cromatina y a la presencia de las protaminas. Por este motivo, la sensibilidad de estas técnicas en los espermatozoides requieren un procedimiento previo de dispersión de cromatina donde las protaminas como las proteínas teloméricas que forman dímeros o tetrámeros se extraen, permitiendo la dispersión de los telómeros individuales permitiendo su análisis (Mudrak et al., 2012; Ward, 1991).

6. RESULTADOS

En el presente estudio se han incluido artículos transversales, prospectivos y caso control con los que realizar un MA y una revisión sistemática (RS). Debido a la heterogeneidad de las medidas de asociación entre los diferentes estudios no se pudo realizar el MA por lo que los resultados de este estudio muestran únicamente una RS.

Entre los estudios seleccionados se incluyen el análisis de muestras de semen y análisis de muestras de sangre. Además, el origen de los artículos corresponde a diferentes países, 1 artículo de Brasil, 4 de China, 5 de España, 2 de Estados Unidos, 2 de India, 6 de Irán, 1 de Israel, 4 de Italia, 1 de Portugal y 3 de Reino Unido. Los estudios analizados presentan diferentes metodologías, para la medición de la LTE o LTL se han usado dos métodos principalmente, que son q-PCR y FISH. El método q-PCR ha sido más utilizado, probablemente debido a que tiene un coste inferior. Los resultados obtenidos con ambos métodos han sido similares.

Los resultados muestran un aumento de la LTE con los parámetros de calidad de los espermatozoides, viabilidad embrionaria, edad paterna en el momento de la concepción y con la edad. Mientras que se observa una disminución de la LTE asociada a la presencia de ERO.

En este apartado se realizará un análisis de los motivos por los que puede ser útil la investigación en este ámbito, mostrando información relacionada que ayude a la comprensión de los resultados, se incluirán los resultados obtenidos en la RS y las áreas en las que es necesario incorporar nuevas investigaciones.

AUTOR	NOMBRE DEL ESTUDIO	PAÍS	DISEÑO	METODOLOGÍA	MUESTRA	PARÁMETRO	RESULTADOS	CALIDAD
ROCCA 2016	Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men	Italia	Prospectivo	Fragmentación ADN → ensayo TUNEL reemplazamiento histonas → anilinie test LTE → qPCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, 4) Fragmentación DNA Protaminación	LTE cpsig MT, VT y protaminación LTE cnsig fragmentación	5/9
LAFUENTE 2017	Sperm telomere length in motile sperm selection techniques - A qFISH approach	España, Estados Unidos	Cross-sectional	LTE → qFISH descondensación DNA → haloos fragmentación DNA → Comet assay	Muestras de semen	(1, -, 3, -) Fragmentación DNA	LTE cpsig espermatozoides inmóviles, tasas de embarazo ERO NC	11/14
FERLIN 2013	In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age	Italia	Prospective	LTE → PCR	Muestras de semen	(1, -, -, -)	LTE cpsig concentración y edad padres	8/9
CARIATI 2016	Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality	Italia	Cross-sectional	LTE → qPCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	LTE cpsig diploidías	11/14
THILAGAVA THI 2013	Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss	India	Cross-sectional	LTL → qPCR	Muestras de semen	(-, -, -, -)	LTL cpsig PIRE	7/14
MISHRA 2016	Mild oxidative stress is beneficial for sperm telomere length maintenance	India	Case-control	ERO → quimioluminiscencia 8-Isoprostane → ELISA LTE → PCR	Muestras de semen	(1, -, 3, -) Fragmentación DNA	LTE cpsig concentración y motilidad LTE y ERO moderadas alargamiento	9/12
DARMISHON NEJAD 2020	Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men	Irán	Cross-sectional	Fragmentación ADN → ensayo TUNEL Deficiencia protamina → CMA3 peroxidación lipídica → BODIPY LTE → qPCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -) Fragmentación DNA	LTE cpsig concentración, morfología, MT LTE cnsig ERO y protaminación LTE NC LTL	10/14
BAIRD 2005	Telomere instability in the male germline	UK	Cross-sectional	TRF → Southern hybridization STELA → PCR	Muestras de semen	(-, -, -, -)	LTE y edad de los individuos Factores relacionados con acortamiento	10/14
THILAGAVA THI 2013	Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility	Irán	Cross-sectional	LTE → qPCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	LTE cpsig fertilidad, concentración, morfología	11/14

												LTE NC motilidad progresiva y edad
VECOLI 2017	Effects of Highly Polluted Environment on Sperm Telomere Length - A Pilot Study	Italia	Cohorte	LTE → qPCR	Muestras de semen	de (-, -, -, -)						LTE y factores ambientales 7/9
TAHAMTAN 2019	Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity	Irán	Cross-sectional	Fragmentación ADN → ensayo TUNEL Deficiencia protamina → CMA3 LTE → qPCR	Muestras de semen	de (1, 2, 3, -)	Fragmentación DNA Integridad cromatina					LTE cpsig fertilidad, concentración espermatozoides, morfología, motilidad, PAC, asociada con LTL LTE cnsig ERO LTE NC edad
SANTANA 2019	The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases	Brasil	Cross-sectional	Fragmentación ADN → SCD Metilación DNA → ELISA LTE → Q-PCR	Muestras de semen	de (1, 2, 3, -)	Fragmentación DNA					LTE cpsig, concentración, morfología, motilidad LTE cnsig ERO No correlación significativa edad
LOPES 2020	Discordance between human sperm quality and telomere length following differential gradient separation-swim-up	Portugal	Cross-sectional	Fragmentación ADN → TUNEL Madurez cromatina → AB Aneuploidías espermáticas → FISH LTE → Q-PCR	Muestras de semen	de (1, -, 3, -)	Fragmentación DNA					8/14
ZHAO 2016	Semen preparation methods and sperm telomere length: density gradient centrifugation versus the swim up procedure	China	Cross-sectional	ERO → NBT LTE → Q-PCR	Muestras de semen	de (1, 2, 3, -)	Fragmentación DNA					10/14
GHORBANI 2020	Comparison of Sperm Telomere Length between Two Sperm Selection Procedures: Density Gradient Centrifugation and Zeta Potential	Irán	Cross-sectional	LTE → Q-PCR Fragmentación ADN → TUNEL	Muestras de semen y sangre	de (1, 2, 3, -)						LTE cpsig morfología, concentración y motilidad LTE NC
TURNER 2013	Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa	UK	Cross-sectional	LTE → qFISH 5-Methylcytosine distinción entre pronúcleo masculino y femenino	Muestras de semen	de (1, 2, 3, 4)						LTE NC concentración, morfología, motilidad y vitalidad 8/14

				Resultados				
DARMISHON NEJAD 2018	Evaluation of sperm telomere length in infertile men with failed/low fertilization after intracytoplasmic sperm injection	Irán	Cross-sectional	integridad cromatina → CMA3 y TUNEL peroxidación lipídica → Bodipy LTE→ Q-PCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	LTE cpsig concentración LTE NC morfología y motilidad	10/14
YANG 2015	Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development	China	Cross-sectional	LTE→ Q-PCR	Muestras de semen	(1, -, -, -)	LTE cpsig concentración	13/14
BERNEAU 2020	Associations of sperm telomere length with semen parameters, clinical outcomes and lifestyle factors in human normozoospermic samples	UK	Cross-sectional	LTE→ Q-PCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, 4)	LTE NC concentración, morfología, motilidad y vitalidad	11/14
ANTUNES 2015	A single-cell assay for telomere DNA content shows increasing telomere length heterogeneity, as well as increasing mean telomere length in human spermatozoa with advancing age	USA	Cross-sectional	LTE→ SCT-pqPCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	LTE cpsig concentración y motilidad LTE NC morfología	9/14
BIRON 2017	Sub-fertile sperm cells exemplify telomere dysfunction	Israel	observational, comparative case control	LTE → qFISH (TERC) captura de telómeros → FISH hTERT → Immunohistochemistry	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	Telomerasa menos activa en pacientes infértiles LTE cpsig concentración, morfología y motilidad	8/12
TORRA 2018	Sperm telomere length in donor samples is not related to ICSI outcome	España	Cross-sectional	LTE→ Q-PCR	Muestras de semen	(1, 2, 3, -)	LTE cpsig concentración LTE NC morfología y motilidad	10/14
LARA 2020	Microsurgical varicocelelectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters	España	Cross-sectional	Dispersión cromatina → SCD LTE→ qFISH-PNA Fragmentación ADN → Comet assays	Muestras de semen	(-, -, -, -)	varicocelelectomía mejora los niveles de ERO y LTE	13/14
SUN 2015	Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques	China	Cross-sectional	Fragmentación ADN → SCD LTE→ Q-PCR	Muestras de semen	(1, -, -, -)	LTE cpsig concentración	12/14
REIG_VIADE R 2014	Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility	España	Cross-sectional	LTE → qFISH Homeostasis telomérica → Inmunofluorescencia	Muestras de semen	(-, -, -, -)	TERT disminuye en pacientes infértiles LTE muy Variable	9/14

Resultados

				TERRA → RNA-fluorescent In Situ Hybridization				Asociaciones TERRA-TERT no están alteradas en LTE pacientes infértiles	
HEIDARY 2018	An Association Study between Longitudinal Changes of Leukocyte Telomere and the Risk of Azoospermia in a Population of Iranian Infertile Men	Irán	Cross-sectional	LTE → PCR	Muestras de semen y Sangre	(-, -, -, -)		LTL to HBG (T/S) ratio of males affected by azoospermia no resultados de interés no analiza LTE específicamente	7/14
SANTISO 2010	Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length	España	Cross-sectional	LTE → Q-PCR Fragmentación DNA → SCD	Muestras de semen	(-, -, -, -)		Diferencias en LTE y ERO tras el método swim-up	7/14
YANG 2018	Shorter leukocyte telomere length is associated with risk of nonobstructive azoospermia	China	Cross-sectional	LTL → q-PCR	Muestras de Sangre	(-, -, -, -)			10/14

Tabla 2. Resultados Obtenidos de la proforma. Valores establecidos parámetros espermáticos: 1 - Concentración espermática, 2 – Morfología, 3 – Motilidad, 4 – Vitalidad. Abreviaturas establecidas para metodologías empleadas: Sperm Chromatin Dispersion (SCD), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), single-cell telomere length assay (SCT-pqPCR), acidic aniline blue (AB), photometric nitro blue tetrazolium (NBT). Parámetros establecidos para resultados: correlación positiva significativa (cpsig), correlación positiva No significativa (cpNsig), No correlación (NC), correlación negativa No significativa (cnNsig), correlación negativa significativa (cnsig)

6.1. RELACIÓN ENTRE LTE Y ERO

En el conjunto global de artículos las ERO son un factor determinante tanto asociado a la LT como indicador de fertilidad. Se han encontrado resultados heterogéneos entre ellos destaca que de los 28 totales, 13 estudios analizaron la relación entre LTE y ERO, de los cuales 7 mostraron una correlación negativa significativa (Darmishonnejad et al., 2019, 2020; Lopes et al., 2020; Mishra et al., 2016; Rocca et al., 2016; Tahamtan et al., 2019; Zhao et al., 2016), seguido de una no correlación significativa en 4 estudios (Cariati et al., 2016; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013; Turner & Hartshorne, 2013) y por último una correlación negativa no significativa en 2 artículos (Lara-Cerrillo et al., 2020; Santana et al., 2019). Estos resultados concuerdan con resultados anteriores ya publicados

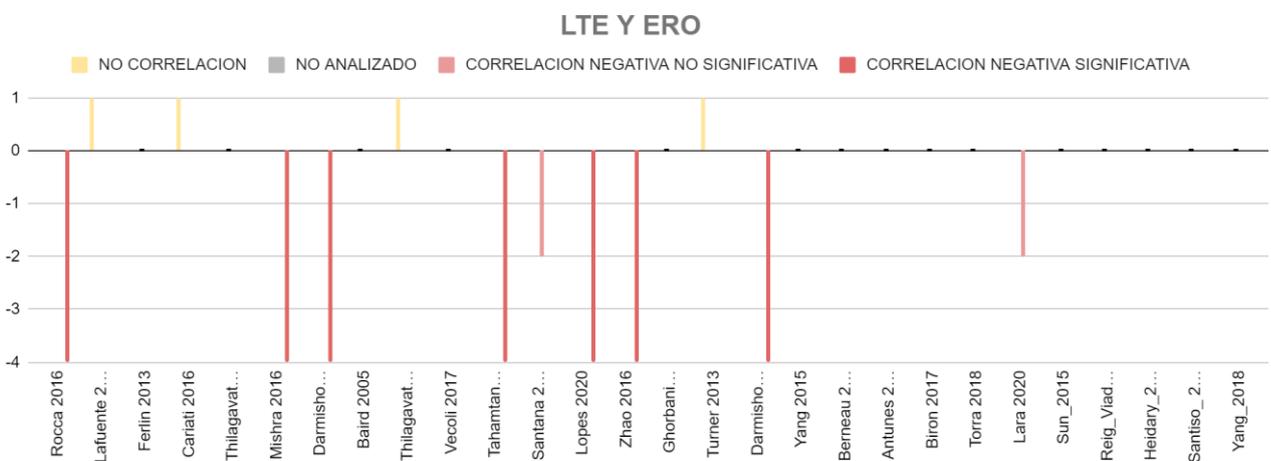


Figura 4. Grafica comparativa de resultados entre LTE y ERO encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor -2 indica una correlación no significativa negativa y el valor -4 indica una correlación negativa significativa. Varios artículos no presentan análisis.

6.2. RELACIÓN ENTRE LTE Y FERTILIDAD

En la valoración de la relación entre la LTE y la fertilidad, los estudios suelen seleccionar un grupo de pacientes infértiles y se analiza aquellos factores diferenciales en comparación con los individuos fértiles. Entre los pacientes infértiles que se incluyen, las enfermedades relacionadas con la infertilidad han sido OZ, NOZ, AZ o VC.

Los resultados encontrados muestran que la LTE es menor en hombres infértiles, y han obtenido menores ratios de fertilización. De los 28 estudios analizados, 11 estudios abordaron esta cuestión, entre los cuales se observó una correlación positiva significativa en 7 de los artículos entre la LTE y la fertilidad (Berneau et al., 2020; Biron-Shental et al., 2018; Darmishonnejad et al., 2019; Lafuente et al., 2018; Mishra et al., 2016; Tahamtan et al., 2019; Thilagavathi, Mishra, et al., 2013), además se observó una correlación no significativa entre LTE y fertilidad en 2 de los artículos (Santana et al., 2019; Yang, Zhao, et al., 2015), y se observó una correlación positiva no significativa en los artículos

(Lopes et al., 2020; Yang, Zhao, et al., 2015). Estos resultados pueden ser confusos debido a que en numerosas ocasiones los hombres infértiles analizados también presentan peores parámetros de calidad espermática y una mayor asociación a ERO.

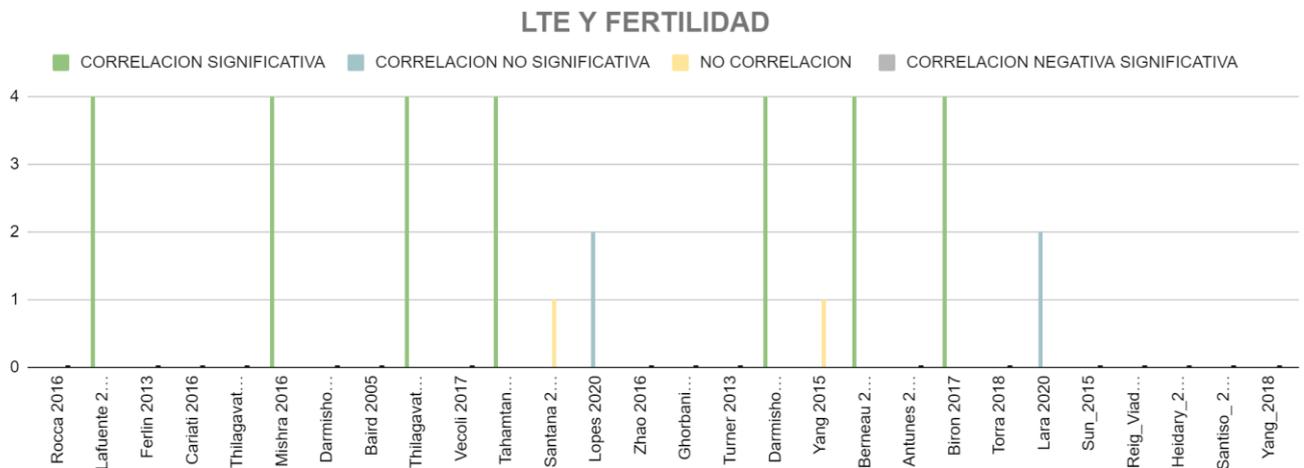


Figura 5. Gráfica comparativa de resultados entre LTE y fertilidad encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor 2 indica una correlación no significativa y el valor 4 indica una correlación significativa. Varios artículos no presentan análisis.

6.3. RELACIÓN ENTRE LTE Y LA EDAD

Los resultados obtenidos en esta revisión sistemática indican que LTE aumenta con la edad. Así pues, la LTE se correlaciona positivamente con la edad paterna en el momento de la concepción y con la viabilidad embrionaria.

De los 28 estudios analizados se observó una correlación positiva significativa en 6 de los artículos (Antunes et al., 2015; Baird et al., 2006; Darmishonnejad et al., 2020; Ghorbani-Sini et al., 2020; Turner & Hartshorne, 2013; Yang, Zhao, et al., 2015), además se observó una correlación no significativa en 6 de los artículos (Berneau et al., 2020; Darmishonnejad et al., 2019; Tahamtan et al., 2019; Thilagavathi, Kumar, et al., 2013; Torra-Massana et al., 2018; Vecoli et al., 2017), y se observó una correlación positiva no significativa en los artículos (Lopes et al., 2020; Santana et al., 2019). Estos resultados son consistentes con los estudios anteriores que muestran una LTE más larga en hombres mayores (Aston et al., 2012; Baird et al., 2006; Ferlin et al., 2013) y podría considerarse como un potencial beneficioso efecto de la edad paterna más avanzada en la salud de la descendencia.

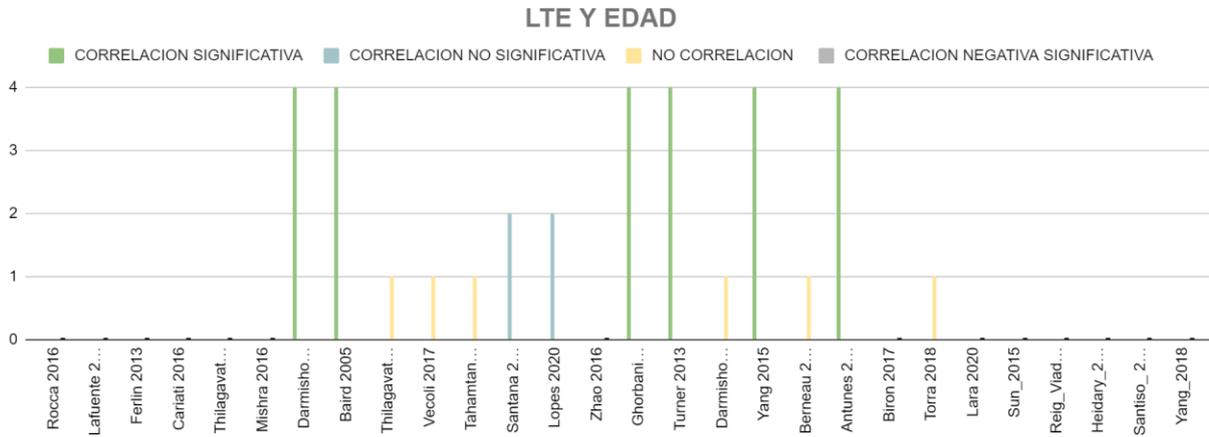


Figura 6. Grafica comparativa de resultados entre LTE y fertilidad encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor 2 indica una correlación no significativa y el valor 4 indica una correlación significativa. Varios artículos no presentan análisis.

6.4. RELACIÓN DE LA LTE Y PARAMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA

Los resultados de la revisión sistemática muestran que la LTE es menor en hombres con baja calidad de los parámetros espermáticos. Estos resultados concuerdan con resultados anteriores. De los 28 estudios analizados se analizan los parámetros de calidad espermática en 20 de ellos, entre los artículos se observó una correlación positiva significativa en 18 de los artículos (Antunes et al., 2015; Biron-Shental et al., 2018; Cariati et al., 2016; Darmishonnejad et al., 2019, 2020; Ferlin et al., 2013; Ghorbani-Sini et al., 2020; Lafuente et al., 2018; Lopes et al., 2020; Mishra et al., 2016; Rocca et al., 2016; Santana et al., 2019; Tahamtan et al., 2019; Thilagavathi, Kumar, et al., 2013; Torra-Massana et al., 2018; Yang, Zhang, et al., 2015; Yang, Zhao, et al., 2015; Zhao et al., 2016) y se observó una no correlación en 2 de los artículos (Berneau et al., 2020; Turner & Hartshorne, 2013).

Estos resultados pueden ser confusos debido a que en numerosas ocasiones los hombres infértiles analizados también presentan peores índices de fertilidad y una mayor asociación a ERO. A pesar de que no se analizaron todos los parámetros en todos los estudios, el parámetro que presenta una mayor asociación con la LTE es la concentración de espermatozoides.

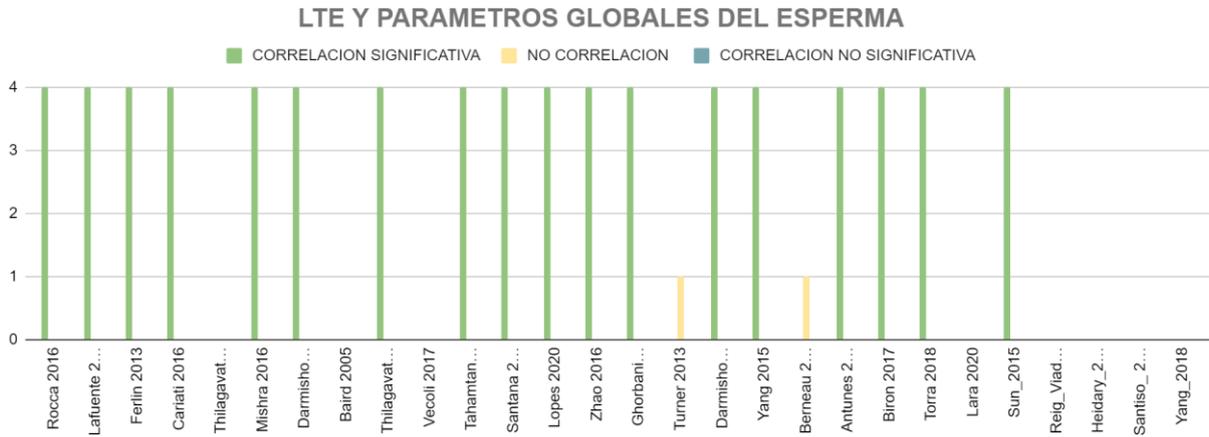


Figura 7. Grafica comparativa de resultados entre LTE y parámetros de calidad espermática encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor 2 indica una correlación no significativa y el valor 4 indica una correlación significativa. Varios artículos no presentan análisis.

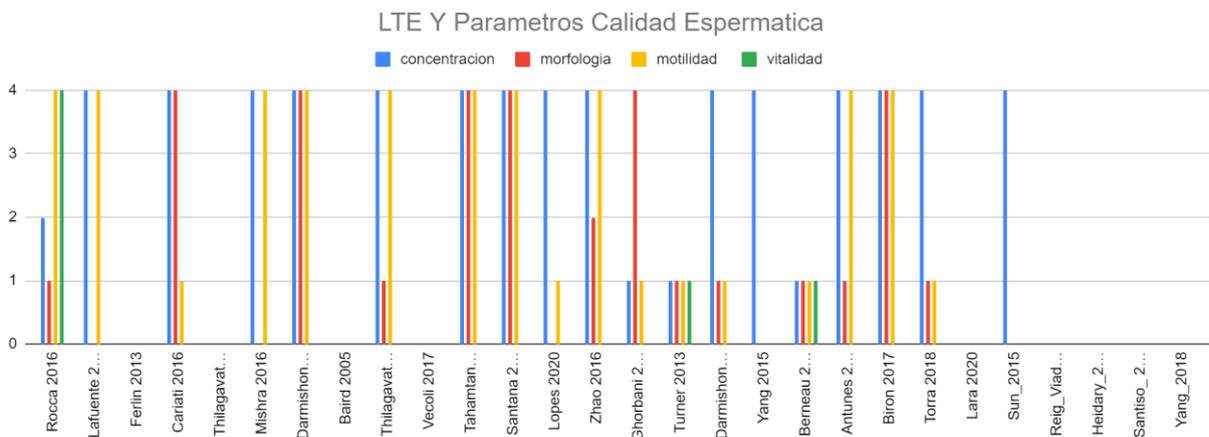


Figura 8. Desglose de resultados entre LTE y parámetros de calidad espermática. La grafica muestra la concentración, morfología, motilidad y vitalidad de los espermatozoides de los artículos analizados.

6.5. RELACIÓN ENTRE LA LTE Y LA VIABILIDAD EMBRIONARIA

En este apartado se muestran algunos de los problemas asociados a la viabilidad embrionaria una vez ya producida la fertilización. De los 28 estudios analizados solo abalzan la viabilidad embrionaria en 6 artículos de los que se observó una correlación positiva significativa en 3 de los artículos (Biron-Shental et al., 2018; Cariati et al., 2016; Yang, Zhao, et al., 2015), se observó una no correlación en 2 de los artículos (Berneau et al., 2020; Lopes et al., 2020) y una correlación positiva no significativa en 1 artículo (Torra-Massana et al., 2018). Así pues, los resultados sugieren que existe una correlación entre la LTE y la viabilidad embrionaria.

A pesar de que los autores mencionan que las poblaciones de espermatozoides son muy variables entre individuos e incluso dentro del mismo individuo (Biron-Shental et al., 2018). Entre los resultados encontrados, los estudios han indicado que la medición de la LTE puede proporcionar información

útil sobre el potencial reproductivo. Además, indican que una menor LTE se asocia a una menor LTL de los hijos, incapacidad de embarazos viables, mala morfología del embrión, aumento ratios de anomalías cromosómicas y PIRE (Yang, Zhao, et al., 2015).

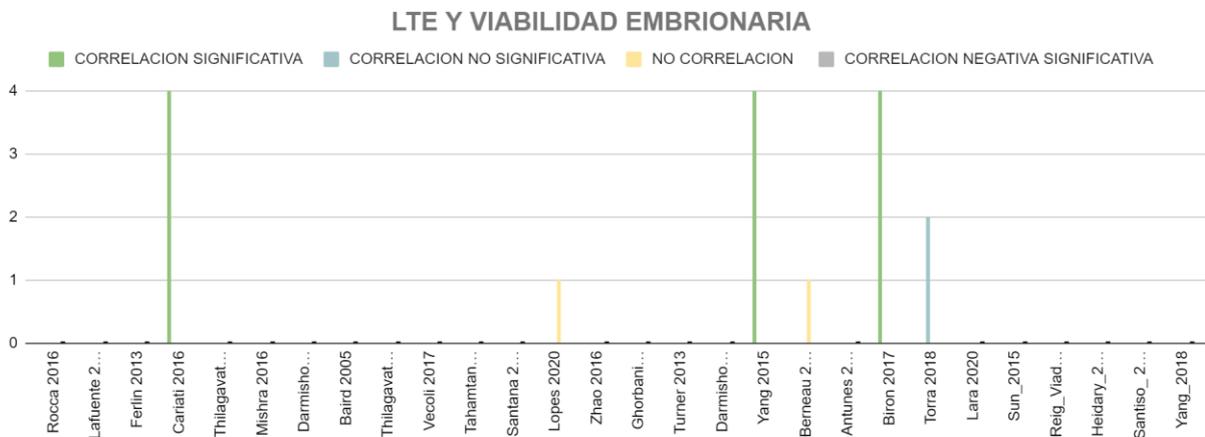


Figura 9. Grafica comparativa de resultados entre LTE y viabilidad embrionaria encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor 2 indica una correlación no significativa y el valor 4 indica una correlación significativa. Varios artículos no presentan análisis.

6.6. RELACIÓN ENTRE LA LT Y LA EDAD DE LOS PROGENITORES EN EL MOMENTO DE LA CONCEPCION

Uno de los resultados interesantes encontrados fue la relación entre la edad de los padres al momento de la concepción y la LTE de la descendencia. Concretamente se encontró que la LTE fue más larga en la descendencia de padres y madres mayores, este incremento también se observó en otras células como por ejemplo en LTL. De los 28 estudios analizados, únicamente 5 estudios incluyeron estos datos. Se observó una correlación positiva significativa en 3 de los artículos (Ferlin et al., 2013; Tahamtan et al., 2019; Yang, Zhao, et al., 2015), se observó una correlación positiva no significativa en 1 de los artículos (Yang, Zhang, et al., 2015) y se observó una correlación no significativa en 1 de los artículos (Darmishonnejad et al., 2019).

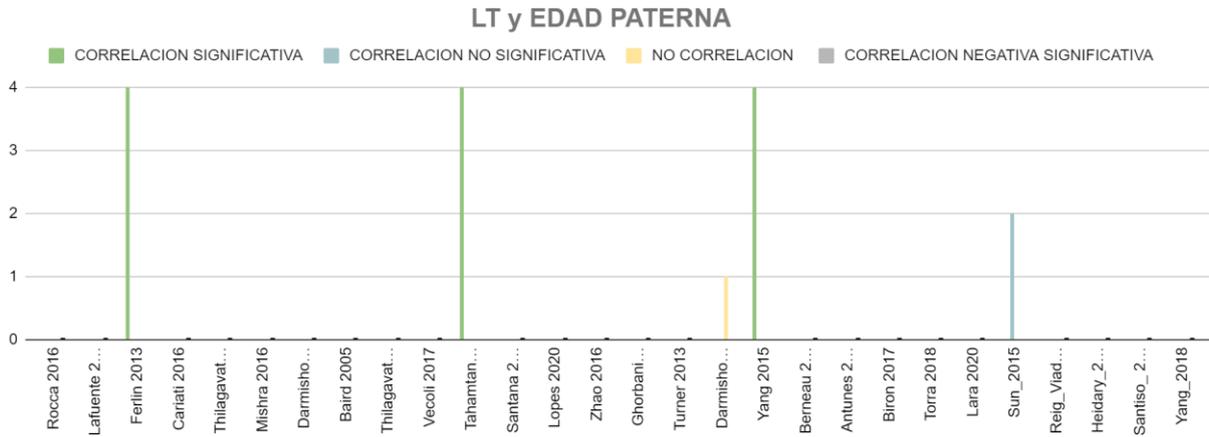


Figura 10. Grafica comparativa de resultados entre LTE y edad paterna encontrados en los artículos seleccionados. El valor 1 indica no correlación, valor 2 indica una correlación no significativa y el valor 4 indica una correlación significativa. Varios artículos no presentan análisis.

Los resultados de diferentes estudios han demostrado que la influencia de la edad paterna en la LT del cigoto es importante, pero se desconocen los mecanismos implicados.

Se ha optado por no incluir el gráfico de los artículos relacionados con la edad materna debido a que únicamente lo mencionan tres de los autores de todos los textos seleccionados y sus resultados son confusos (Darmishonnejad et al., 2019; Ferlin et al., 2013; Yang, Zhao, et al., 2015).

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha realizado una revisión sistemática que muestra una información detallada de los factores que relacionan la LT y la calidad espermática. Estos datos sugieren que una mayor LTE puede tener un impacto positivo en la calidad del espermatozoides impactando en la fertilidad. Estos resultados están en concordancia con literatura científica actual (Gentiluomo et al., 2021).

En los estudios transversales analizados, debido al bajo número de muestras -que en muchas ocasiones sin justificación estadística de la representación de esta por parte de los autores- se ha llegado a resultados heterogéneos. Al analizar en profundidad los resultados y ver de forma comparativa los resultados que, si bien no presentaban una correlación significativa, en los gráficos mostrados se podía apreciar una cierta tendencia positiva (o neutra en el peor de los casos). Este hecho ha sido la norma en todos los estudios en los que no se han alcanzado correlaciones.

Tomando como referencia los parámetros medidos en este estudio, si los estudios son comparativos o si el número de muestras es superior a 70 en los estudios correlativos e incluyen individuos con parámetros seminales normales al compararlos con algún paciente de algún grado de infertilidad se consigue encontrar correlaciones entre parámetros.

Se obtiene el mismo fenómeno al analizar la relación de la LT con la edad en un grupo mayor de sujetos. Si bien en nuestros resultados se muestran algunos estudios que no siempre se alcanzan una correlación de la LT y la edad, podemos encontrar varios estudios con un gran número de participantes (n= 418 y , n = 135) donde a pesar de encontrar una tendencia leve ($r = 0.1$ y $r = 0.32$) sí que existe una correlación ($p=0.04$ y $p<0.01$) (Yang, Zhao, et al., 2015) y (Aston et al., 2012) respectivamente. Además, muchas de las características de los pacientes como la edad, el IMC (Índice de Masa Corporal) o la alimentación son elementos olvidados en algunos de los estudios analizados que podrían explicar algunas diferencias observadas entre estudios, ya que como se ha visto, estos factores pueden tener un impacto en la LT (Canudas et al., 2020), e incluir estos factores podría aportar una información más precisa.

7.1. JUSTIFICACION DE LOS VALORES OBTENIDOS

7.1.1. RELACIÓN ENTRE LTE Y ERO

Es conocido que los defectos en el ADN pueden poner en peligro el proceso de espermatogénesis, afectando negativamente en el empaquetamiento de la cromatina e incluso la integridad del ADN (Berneau et al., 2020). Se ha visto con anterioridad que la gametogénesis masculina es un proceso

selectivo que acostumbra a inducir la apoptosis en células con presencia de alguna alteración. Como los niveles altos de estrés oxidativo pueden afectar la integridad genómica de los espermatozoides, causar fragmentación del ADN y daños en la estructura de la cromatina, que pueden resultar en un gran número de espermatozoides senescentes, que disminuyen la concentración total y en casos extremos afectar a la fertilidad.

Además, en varios estudios se mencionó un aumento de aneuploidías en aquellos pacientes con altos niveles de ERO y en otros una correlación positiva entre los niveles de daño en el ADN de los espermatozoides y las tasas de aneuploidía. Es sabido que existe una correlación inversa entre la tasa de aneuploidía y la mortalidad de los espermatozoides (Cariati et al., 2016). Otros estudios muestran que al reducir el estrés oxidativo y aumentar componentes antioxidantes se puede desacelerar el acortamiento debido a una regulación positiva en la actividad de la telomerasa y una disminución en los niveles de radicales libres, bases mutagénicas oxidadas (Mishra et al., 2016).

En el caso de estudios que valoraban enfermedades relacionadas como OZ, NOZ, AZ o VC se muestra con frecuencia una LTE reducida, una alta fragmentación del ADN y tasas de aneuploidía elevadas. Si bien esto no es un motivo para justificar directamente el daño de las ERO en la LT si se han encontrado disminuciones en la concentración de espermatozoides, aumentos en las tasas de aneuploidías y mayores niveles de ERO. Todos estos factores son sintomáticos de procesos meióticos y espermatogénicos que están comprometidos y que acaban afectando a la LTE y a la fertilidad.

7.1.2. RELACIÓN ENTRE LTE Y PARAMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA

La LTE está relacionada con el recuento de espermatozoides, concentración, morfología, motilidad y vitalidad de los espermatozoides. Se han observado telómeros más cortos en los varones con peores parámetros de calidad espermática. Muchos de estos parámetros están asociados a enfermedades relacionadas con la fertilidad, por lo que muchos de los individuos se clasificaron como sujetos que padecían AZ, OZ, NZ o VC.

7.1.3. RELACIÓN ENTRE LTE Y VIABILIDAD EMBRIONARIA

En los estudios revisados se afirma que la LTE afecta al desarrollo del embrión, se ha propuesto que los espermatozoides con telómeros cortos pueden no responder a las señales de los ovocitos para formar un pronúcleo, derivando en una división deficiente, mala morfología en los embriones, limitación del potencial de crecimiento y fallos en la implantación (Liu et al., 2002; Torra-Massana et al., 2018). Estas hipótesis están en concordancia con nuestros resultados y podrían estar relacionados con estudios que proponen que los espermatozoides con una longitud de telómeros acortada son incapaces de unirse a SUN1 y KASH5 en la membrana nuclear para inducir la

descondensación nuclear y por lo tanto la formación correcta del embrión (Darmishonnejad et al., 2019). También se ha sugerido que la LTE más larga puede ser un indicador mediante el cual los ovocitos aseguran que el desarrollo embrionario se inicie con un espermatozoide con la cromatina intacta (Cariati et al., 2016; Darmishonnejad et al., 2019; Liu et al., 2002; Lu et al., 2011; Turner & Hartshorne, 2013).

7.1.4. RELACIÓN ENTRE LA LTE Y LA EDAD DE LOS PROGENITORES EN EL MOMENTO DE LA CONCEPCION:

La edad de concepción de los padres es crítica dado que se ha demostrado que una mayor edad de los padres en el momento de la concepción tiene un efecto negativo tanto en la viabilidad de la descendencia en ratones como en la aptitud general de la descendencia en humanos y el envejecimiento está vinculado a problemas de fertilidad, como la disminución de las hormonas masculinas y la calidad del espermatozoide (Berneau et al., 2020). En cambio, nuestros resultados sugieren que padres mayores pueden presentar una mayor LTE siendo beneficioso a nivel de fertilidad y en la salud de la descendencia. La diferencia en la LT con respecto a los hombres jóvenes se cree que es debida a una mayor expresión de la telomerasa para suplir el desgaste sufrido en las células germinales. Al parecer, los estudios analizados sugieren que este mecanismo es sobrecompensatorio, con lo que hombres de mayor edad, acaban presentando una mayor LTE potencialmente beneficiosa para la fertilidad.

Además, como factor adicional se cree que la contribución de la edad paterna a la LTL de la descendencia es mayor que la contribución materna (Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, 2017; Yang, Zhang, et al., 2015). Estudios anteriores han mostrado de que la LTL media en humanos está asociada a la longitud de los telómeros en otros tejidos (Heidary et al., 2018), es por ello que estos resultados pueden ser tan interesantes y se podría valorar la posibilidad de incluir la LTL como biomarcador de fertilidad. Este hecho necesita ser comprobado debido al bajo número de estudios analizados que presentan esta información.

7.2. HIPOTESIS DEL ALARGAMIENTO DE LOS TELOMEROS Y FERTILIDAD

Entre las hipótesis encontradas en los diversos estudios, se recoge la idea de que la descendencia nacida de padres mayores tiene telómeros más largos (Berneau et al., 2020), esto se debe a un mecanismo de sobrecompensación mediante el cual la telomerasa se expresa más en células germinales para compensar las pérdidas ocasionadas por la replicación. Este alargamiento se mantendrá en los telómeros de los espermatozoides y dará lugar a que espermatozoides fecundantes tengan una LT mayor (Graakjaer et al., 2004; Turner & Hartshorne, 2013).

Como la longitud de los telómeros se considera un valioso biomarcador potencial de la edad biológica, funciona como un pronosticador de la longevidad, está parcialmente determinada genéticamente y está notablemente sesgada por la edad paterna, sería de gran interés comprobar si la selección de espermatozoides con un mayor LT podría contribuir a aumentar la longevidad de su descendencia y en última instancia la de la especie (Santiso et al., 2010b).

Esta sería una línea de investigación interesante que se podría también analizar desde otra perspectiva, dado que los telómeros son más cortos en los espermatozoides de hombres infértiles (Thilagavathi, Kumar, et al., 2013) se podría analizar si trastornos como OZ, NOZ, AZ o VC tienen implicaciones en la reducción de la longevidad de sus descendientes, ya que en estos casos la descendencia tenderá a heredar telómeros más cortos (Ferlin et al., 2013).

8. CONCLUSIONES

En conclusión, las tendencias actuales, los nuevos hábitos de vida, el aumento de la esperanza de vida de las personas y el consumo de alimentos nocivos han propiciado un auge en las enfermedades relacionadas con la infertilidad. Este aumento de casos junto con el hecho de que los índices de calidad espermática clásicos no son siempre determinantes a la hora de medir la fertilidad de los varones surge la necesidad de incorporar nuevos indicadores que faciliten la detección de las causas que pueden estar relacionadas con la infertilidad de los pacientes no diagnosticados.

La LT es un factor relevante ya que funciona como indicador de la edad biológica de los individuos, puede determinar el momento en el que los individuos alcanzan su mayor potencial reproductivo. Es por ello por lo que en el presente estudio hemos profundizado en el impacto de la LT en la fertilidad para saber si es posible la utilización de la LT como un factor más de diagnóstico.

En los estudios analizados en esta revisión sistemática se ha concluido que la infertilidad se asocia en mayor frecuencia con la presencia de telómeros cortos. Además, una mayor LTE está asociada con una alta calidad de los parámetros del semen (concentración de espermatozoides, motilidad y morfología). La LT se correlaciona positivamente con la edad paterna en el momento de la concepción y con la viabilidad embrionaria. Se ha podido comprobar que la LT está íntimamente ligada con los daños por ERO que conllevan a la fragmentación y desprotección del ADN en las zonas terminales de los cromosomas pudiendo afectar en la viabilidad celular y la fertilidad.

Aunque este estudio identifica las principales asociaciones de varios factores de infertilidad y LT, el estudio cuenta con ciertas limitaciones debido al número relativamente bajo de estudios relevantes publicados hasta la fecha. También hay que destacar que, si bien los resultados globales obtenidos muestran una tendencia clara, esta tendencia no es común en el total de los artículos analizados ya que no todos los artículos muestran las mismas tendencias e incluso son imperceptibles en algunos de ellos.

Además, se conoce la relación de la LT con una serie de factores establecidos, pero el mecanismo subyacente de la infertilidad humana sigue sin ser conocido. Por lo que a pesar de los resultados obtenidos son necesarios nuevos estudios que muestren el mecanismo de interacción de los telómeros que junto con otros factores desencadena la infertilidad humana.

9. AUTOEVALUACIÓN

Honestamente, considero que este proyecto de investigación ha sido la una de las mejores experiencias de la carrera. He sido capaz de integrarme totalmente en un grupo de investigación y poder participar en un estudio de mi interés que ha resultado ser un estudio de investigación realmente importante. Este proyecto de investigación me ha permitido colaborar con investigadores expertos, en una unidad de Nutrición Humana dirigida por el Profesor Jordi Salas Salvadó que me ha permitido desarrollar mis habilidades en un entorno real. Pese a la problemática situación actual del COVID-19 hemos sido capaces de organizarnos y realizar una labor propia de investigación, solventando los retrasos y acontecimientos inesperados.

Este proyecto me ha permitido encontrar nuevos campos de conocimiento que complementan mi aprendizaje durante la carrera y me ha permitido mejorar el entendimiento de la biología.

Desde el principio se me permitió integrarme en el área de mi selección y se me busco un proyecto acorde con mis expectativas, que eran muy altas. Siempre he tenido la sensación de estar acompañado y que el proyecto era perfecto para mis intereses. Durante el desarrollo de este trabajo de final de grado he aprendido cómo funciona la investigación científica de manera real, y cómo se organiza un grupo de investigación y las tareas que en él realizan sus componentes. Además, he sido capaz de aumentar mis conocimientos en la biología de molecular y como proceder a la hora de realizar tareas de mayor envergadura.

10. Agradecimientos Personales

Querría agradecer el esfuerzo y el apoyo a:

Silvia Canudas Puig, por ser la persona que me permitió entrar en la unidad, incluirme desde el inicio en un grupo de trabajo en el que ella participaba y por haberme apoyado durante el transcurso de todos estos meses. Siempre tuvo paciencia conmigo y fue capaz de procurarme todo lo que era necesario en cada momento. Realmente te deseo lo mejor en tu nuevo puesto, únicamente por que lo mereces.

Pablo Hernández Alonso, fue la persona de la unidad que trato de incorporar elementos de informática conmigo, me propuso proyectos y tareas que me han resultado muy interesantes. Ha sido capaz de orientarme y transmitirme una gran cantidad de conocimientos. Por todo, gracias.

María Fernández De La Puente Cervera, mi compañera de laboratorio e investigadora que ha realizado conmigo gran parte de este proyecto. Ha sido de gran ayuda tenerte al lado estos meses y espero que acabes geniales el doctorado.

Jordi Salas Salvadó, líder de la Unidad de Nutrición Humana por haberme aceptado en la Unidad, confiar en mí y permitirme ser un miembro del equipo más.

A los todos los miembros de la Unidad de Nutrición, con los que me he sentido más que integrado y que me han permitido disfrutar de un gran ambiente de trabajo. Muchísimas gracias por hacer esta experiencia más enriquecedora.

A todos los amigos que me han apoyado moralmente durante estos cuatro meses, simplemente gracias, no solo por ser una buena fuente de inspiración y vía de escape en muchas ocasiones.

A mi familia, especialmente mi padre y mi madre. Gracias por ser mi motivación diaria para comenzar y seguir trabajando en esta investigación.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2009). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, *16*(1), 3–13.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap059>
- Antunes, D. M. F., Kalmbach, K. H., Wang, F., Dracxler, R. C., Seth-Smith, M. L., Kramer, Y., Buldo-Licciardi, J., Kohlrausch, F. B., & Keefe, D. L. (2015). A single-cell assay for telomere DNA content shows increasing telomere length heterogeneity, as well as increasing mean telomere length in human spermatozoa with advancing age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(11), 1685–1690. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0574-3>
- Aston, K. I., Hunt, S. C., Susser, E., Kimura, M., Factor-litvak, P., Carrell, D., & Aviv, A. (2012). Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: Implications for male-driven evolution of telomere length in humans. *Molecular Human Reproduction*, *18*(11), 517–522. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas028>
- Baird, D. M., Britt-Compton, B., Rowson, J., Amso, N. N., Gregory, L., & Kipling, D. (2006). Telomere instability in the male germline. *Human Molecular Genetics*, *15*(1), 45–51.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi424>
- Berneau, S. C., Shackleton, J., Nevin, C., Altakroni, B., Papadopoulos, G., Horne, G., Brison, D. R., Murgatroyd, C., Povey, A. C., & Carroll, M. (2020). Associations of sperm telomere length with semen parameters, clinical outcomes and lifestyle factors in human normozoospermic samples. *Andrology*, *8*(3), 583–593. <https://doi.org/10.1111/andr.12734>
- Biron-Shental, T., Wisner, A., Hershko-Klement, A., Markovitch, O., Amiel, A., & Berkovitch, A. (2018). Sub-fertile sperm cells exemplify telomere dysfunction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *35*(1), 143–148. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1029-9>
- Blackburn. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, *354*, 737–740.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, *12*(10), 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/nm1006-1133>
- Canudas, S., Becerra-Tomas, N., Hernandez-Alonso, P., Galie, S., Leung, C., Crous-Bou, M., De Vivo, I., Gao, Y., Gu, Y., Meinila, J., Milte, C., Garcia-Calzon, S., Marti, A., Boccardi, V., Ventura-Marra, M., & Salas-Salvado, J. (2020). Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition*, *11*(6), 1544–1554.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmaa079>
- Canudas, S., Hernández-Alonso, P., Gali, S., Muralidharan, J., Morell-Azanza, L., Zalba, G., García-

- Gavilán, J., Martí, A., Salas-Salvadó, J., & Bulló, M. (2019). Pistachio consumption modulates DNA oxidation and genes related to telomere maintenance: A crossover randomized clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, *109*(6), 1738–1745.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz048>
- Cao, X. W., Lin, K., Li, C. Y., & Yuan, C. W. (2011). [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, *17*(12), 1059–1063.
- Cariati, F., Jaroudi, S., Alfarawati, S., Raberi, A., Alviggi, C., Pivonello, R., & Wells, D. (2016). Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reproductive BioMedicine Online*, *33*(3), 404–411.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.06.006>
- Coluzzi, E., Colamartino, M., Cozzi, R., Leone, S., Meneghini, C., O’Callaghan, N., & Sgura, A. (2014). Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS ONE*, *9*(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110963>
- Cram, D. S., O’Bryan, M. K., & De Kretser, D. M. (2001). Male infertility genetics - The future. *Journal of Andrology*, *22*(5), 738–746. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02572.x>
- Darmishonnejad, Z., Tavalae, M., Izadi, T., Tanhaei, S., & Nasr-Esfahani, M. H. (2019). Evaluation of sperm telomere length in infertile men with failed/low fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online*, *38*(4), 579–587.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.022>
- Darmishonnejad, Z., Zarei-Kheirabadi, F., Tavalae, M., Zarei-Kheirabadi, M., Zohrabi, D., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Relationship between sperm telomere length and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, *52*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13546>
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., & Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(2), 518–527. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.2.518>
- De Lange, Titia. (2005). Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development*, *19*(18), 2100–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>
- Ferlin, A., Rampazzo, E., Rocca, M. S., Keppel, S., Frigo, A. C., De Rossi, A., & Foresta, C. (2013). In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *28*(12), 3370–3376. <https://doi.org/10.1093/humrep/det392>
- Freitas-Simoes, T. M., Ros, E., & Sala-Vila, A. (2016). Nutrients, foods, dietary patterns and telomere length: Update of epidemiological studies and randomized trials. *Metabolism: Clinical*

- and Experimental*, 65(4), 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.004>
- Gentiluomo, M., Luddi, A., Cingolani, A., Fornili, M., Governini, L., Lucenteforte, E., Baglietto, L., Piomboni, P., & Campa, D. (2021). Telomere length and male fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22083959>
- Ghorbani-Sini, R., Izadi, T., Tavalaei, M., Azadi, L., Hajian, M., Rahimi Zamani, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Comparison of sperm telomere length between two sperm selection procedures: Density gradient centrifugation and zeta potential. *International Journal of Fertility and Sterility*, 14(1), 51–56. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.5981>
- Graakjaer, J., Pascoe, L., Der-Sarkissian, H., Thomas, G., Kolvraa, S., Christensen, K., & Londoño-Vallejo, J. A. (2004). The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell*, 3(3), 97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00093.x>
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51(6), 887–898. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90576-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90576-9)
- Harley B., C., Futcher B., A., & Greider W., C. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. In *Nature* (Vol. 345, pp. 458–460).
- Heidary, H., Pouresmaeili, F., Mirfakhraie, R., Omrani, M. D., Ghaedi, H., Fazeli, Z., Sayban, S., Ghafouri-Fard, S., Azargashb, E., & Shokri, F. (2018). An association study between longitudinal changes of leukocyte telomere and the risk of azoospermia in a population of Iranian infertile men. *Iranian Biomedical Journal*, 22(4), 231–236. <https://doi.org/10.22034/ibj.22.4.231>
- Kim, S. Y., & Velando, A. (2015). Antioxidants safeguard telomeres in bold chicks. *Biology Letters*, 11(5), 211–213. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0211>
- Kozik, A., Bradbury, E. M., & Zalensky, A. (1998). Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)(n) arrays. *Molecular Reproduction and Development*, 51(1), 98–104. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199809\)51:1<98::AID-MRD12>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<98::AID-MRD12>3.0.CO;2-Q)
- Lafuente, R., Bosch-Rue, E., Ribas-Maynou, J., Alvarez, J., Brassesco, C., Amengual, M. J., Benet, J., Garcia-Peiró, A., & Brassesco, M. (2018). Sperm telomere length in motile sperm selection techniques: A qFISH approach. *Andrologia*, 50(2), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.12840>
- Lara-Cerrillo, S., Gual-Frau, J., Benet, J., Abad, C., Prats, J., Amengual, M. J., & García-Peiró, A. (2020). Microsurgical varicocelectomy effect on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters. *Human Fertility*, 7273.

<https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1711204>

- Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M., Devereaux, P. J., Kleijnen, J., & Moher, D. (2009). The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 339.
- <https://doi.org/10.1136/bmj.b2700>
- Liu, L., Blasco, M. A., Trimarchi, J. R., & Keefe, D. L. (2002). An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Developmental Biology*, 249(1), 74–84. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0735>
- Lopes, A. C., Oliveira, P. F., Pinto, S., Almeida, C., Pinho, M. J., Sá, R., Rocha, E., Barros, A., & Sousa, M. (2020). Discordance between human sperm quality and telomere length following differential gradient separation/swim-up. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(10), 2581–2603. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01897-1>
- Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., Songyang, Z., & Wan, M. (2011). Telomeres - Structure, Function, and Regulation. *Exp Cell Res.*, 4(2), 133–141.
- <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.09.005>.Telomeres
- Mazzolini, R., González, N., Garcia-Garijo, A., Millanes-Romero, A., Peiró, S., Smith, S., De Herreros, A. G., & Canudas, S. (2018). Snail1 transcription factor controls telomere transcription and integrity. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 146–158.
- <https://doi.org/10.1093/nar/gkx958>
- Mishra, S., Kumar, R., Malhotra, N., Singh, N., & Dada, R. (2016). Mild oxidative stress is beneficial for sperm telomere length maintenance. *World Journal of Methodology*, 6(2), 163.
- <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i2.163>
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., & Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)(n), present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6622–6626.
- <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622>
- Mudrak, O. S., Nazarov, I. B., Jones, E. L., & Zalensky, A. O. (2012). Positioning of Chromosomes in Human Spermatozoa Is Determined by Ordered Centromere Arrangement. *PLoS ONE*, 7(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052944>
- O’Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 171–181.
- <https://doi.org/10.1038/nrm2848>

- Reig-Viader, R., Capilla, L., Vila-Cejudo, M., Garcia, F., Anguita, B., Garcia-Caldés, M., & Ruiz-Herrera, A. (2014). Telomere homeostasis is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. *Fertility and Sterility*, *102*(3).
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.005>
- Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, N. D. (2017). The association between psychiatric disorders and telomere lengths: A Meta-analysis involving 14,827 persons. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000356>.
- Rocca, M. S., Speltra, E., Menegazzo, M., Garolla, A., Foresta, C., & Ferlin, A. (2016). Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. *Human Reproduction*, *31*(6), 1158–1163. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew061>
- Salas-Huetos, A., Maghsoumi-Norouzabad, L., James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Becerra-Tomás, N., Javid, A. Z., Abed, R., Torres, P. J., Luque, E. M., Ramírez, N. D., Martini, A. C., & Salas-Salvadó, J. (2021). Male adiposity, sperm parameters and reproductive hormones: An updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Obesity Reviews*, *22*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1111/obr.13082>
- Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., & Yan, J. (2010). Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy*, *192*(5), 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.07.005>
- Santana, V. P., Miranda-Furtado, C. L., Pedroso, D. C. C., Eiras, M. C., Vasconcelos, M. A. C., Ramos, E. S., Calado, R. T., Ferriani, R. A., Esteves, S. C., & dos Reis, R. M. (2019). The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *65*(2), 95–104. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1557762>
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., & Fernández, J. L. (2010a). Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertility and Sterility*, *93*(1), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.969>
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., & Fernández, J. L. (2010b). Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *688*(1–2), 88–90.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.03.003>
- Schoeftner, S., & Blasco, M. A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology*, *10*(2), 228–236.
<https://doi.org/10.1038/ncb1685>
- Shravya Keerthi, G., Kiran Kumar, C., & Reddy, N. M. (2015). Association of leukocyte telomere length with oxidative stress in yoga practitioners. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*,

- 9(3), 1–3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13076.5729>
- Siderakis, M., & Tarsounas, M. (2007). Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Research*, 15(5), 667–679. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1149-7>
- Tahamtan, S., Tavalae, M., Izadi, T., Barikrow, N., Zakeri, Z., Lockshin, R. A., Abbasi, H., & Nasr-Esfahani, M. H. (2019). Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. *Scientific Reports*, 9(1), 5–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40707-2>
- Thilagavathi, J., Kumar, M., Mishra, S. S., Venkatesh, S., Kumar, R., & Dada, R. (2013). Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 287(4), 803–807. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2632-8>
- Thilagavathi, J., Mishra, S. S., Kumar, M., Vemprala, K., Deka, D., Dhadwal, V., & Dada, R. (2013). Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(6), 793–798. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9993-1>
- Thilagavathi, J., Venkatesh, S., & Dada, R. (2013). Telomere length in reproduction. *Andrologia*, 45(5), 289–304. <https://doi.org/10.1111/and.12008>
- Torra-Massana, M., Barragán, M., Bellu, E., Oliva, R., Rodríguez, A., & Vassena, R. (2018). Sperm telomere length in donor samples is not related to ICSI outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(4), 649–657. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1104-2>
- Turner, S., & Hartshorne, G. M. (2013). Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 19(8), 510–518. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat021>
- Vecoli, C., Montano, L., Borghini, A., Notari, T., Guglielmino, A., Mercuri, A., Turchi, S., & Andreassi, M. G. (2017). Effects of highly polluted environment on sperm telomere length: A pilot study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081703>
- Ward, C. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*, 7(12), 569–574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052944>
- Yang, Q., Luo, X., Bai, R., Zhao, F., Dai, S., Li, F., Zhu, J., Liu, J., Niu, W., & Sun, Y. (2018). Shorter leukocyte telomere length is associated with risk of nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 110(4), 648–654.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.008>
- Yang, Q., Zhang, N., Zhao, F., Zhao, W., Dai, S., Liu, J., Bukhari, I., Xin, H., Niu, W., & Sun, Y. (2015). Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer

telomeres for assisted reproduction techniques. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.02.016>

Yang, Q., Zhao, F., Dai, S., Zhang, N., Zhao, W., Bai, R., & Sun, Y. (2015). Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development. *Human Reproduction*, 30(8), 1876–1881. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev144>

Zalenskaya, I. A., Bradbury, E. M., & Zalensky, A. O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(1), 213–218. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3917>

Zhao, F., Yang, Q., Shi, S., Luo, X., & Sun, Y. (2016). Semen preparation methods and sperm telomere length: density gradient centrifugation versus the swim up procedure. *Scientific Reports*, 6(August), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep39051>

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1: CONSULTA REALIZADA EN LAS BASES DE DATOS

Consulta realizada en las bases de datos para la extracción de los artículos, se encuentra organizada con estructura de árbol descendente de la siguiente manera:

- Q3 AND (Q 1 OR Q2) && Q6 AND (Q4 OR Q5) && Q7 AND (Q3 AND Q6)

Query 1:

```
"((((("telomere"[MeSH Terms]) OR ("telomere shortening"[MeSH Terms]) OR ("telomere homeostasis"[MeSH Terms])) OR ("telomerase"[MeSH Terms]),,"telomere"[MeSH Terms] OR "telomere shortening"[MeSH Terms] OR "telomere homeostasis"[MeSH Terms] OR "telomerase"[MeSH Terms]),"25,840",12:09:48
```

Query 2:

```
"((((((((("telomere"[All Fields]) OR ("telomere shortening"[All Fields]) OR ("telomere homeostasis"[All Fields])) OR (telomer*)) OR ("telomere length"[All Fields]) OR ("telomerase"[All Fields]) OR ("telomerase activity"[All Fields]) OR ("telomere maintenance"[All Fields]),,"telomere"[All Fields] OR "telomere shortening"[All Fields] OR "telomere homeostasis"[All Fields] OR "telomer*"[All Fields] OR "telomere length"[All Fields] OR "telomerase"[All Fields] OR "telomerase activity"[All Fields] OR "telomere maintenance"[All Fields]),"41,750",12:10:28
```

Query 3:

```
#1 OR #2,,"telomere"[MeSH Terms] OR "telomere shortening"[MeSH Terms] OR "telomere homeostasis"[MeSH Terms] OR "telomerase"[MeSH Terms] OR "telomere"[All Fields] OR "telomere shortening"[All Fields] OR "telomere homeostasis"[All Fields] OR "telomer*"[All Fields] OR "telomere length"[All Fields] OR "telomerase"[All Fields] OR "telomerase activity"[All Fields] OR "telomere maintenance"[All Fields]),"41,750",12:10:37
```

Query 4:

```
"((((((((((((("spermatozoa"[MeSH Terms]) OR ("spermatogenesis"[MeSH Terms]) OR ("sperm motility"[MeSH Terms])) OR ("sperm count"[MeSH Terms]) OR ("sperm maturation"[MeSH Terms]) OR ("sperm capacitation"[MeSH Terms]) OR ("semen"[MeSH Terms]) OR ("semen analysis"[MeSH Terms]) OR ("infertility, male"[MeSH Terms]) OR ("oligospermia"[MeSH Terms]) OR ("aspermia"[MeSH Terms]) OR ("asthenozoospermia"[MeSH Terms]) OR ("azoospermia"[MeSH Terms]) OR ("teratozoospermia"[MeSH Terms]),,"spermatozoa"[MeSH Terms] OR "spermatogenesis"[MeSH Terms] OR "sperm motility"[MeSH Terms] OR "sperm count"[MeSH Terms]
```


OR ""semen quality""[All Fields] OR ""oligospermia""[All Fields] OR ""aspermia""[All Fields] OR ""azoospermia""[All Fields] OR ""asthenozoospermia""[All Fields] OR ""teratozoospermia""[All Fields] OR ""oligozoospermia""[All Fields] OR ""oligoasthenozoospermia""[All Fields] OR ""oligoasthenoteratozoospermia""[All Fields] OR ""male fertility""[All Fields] OR ""sperm dysfunction""[All Fields] OR ""spermatogenesis""[All Fields] OR ""protamine deficiency""[All Fields] OR ""sperm parameters""[All Fields] OR ""sperm dna fragmentation""[All Fields] OR ""sperm dna damage""[All Fields] OR ""varicocele""[All Fields] OR ""non obstructive azoospermia""[All Fields] OR ""erectile dysfunction""[All Fields] OR ""sperm dna extraction""[All Fields] OR ""spermatozoa abnormality""[All Fields] OR ""sperm chromosomal abnormalities""[All Fields]",220,047",12:14:42

Query 7:

#3 AND #6,,("telomere""[MeSH Terms] OR ""telomere shortening""[MeSH Terms] OR ""telomere homeostasis""[MeSH Terms] OR ""telomerase""[MeSH Terms] OR ("telomere""[All Fields] OR ""telomere shortening""[All Fields] OR ""telomere homeostasis""[All Fields] OR ""telomer*""[All Fields] OR ""telomere length""[All Fields] OR ""telomerase""[All Fields] OR ""telomerase activity""[All Fields] OR ""telomere maintenance""[All Fields])) AND ("spermatozoa""[MeSH Terms] OR ""spermatogenesis""[MeSH Terms] OR ""sperm motility""[MeSH Terms] OR ""sperm count""[MeSH Terms] OR ""sperm maturation""[MeSH Terms] OR ""sperm capacitation""[MeSH Terms] OR ""semen""[MeSH Terms] OR ""semen analysis""[MeSH Terms] OR ""infertility, male""[MeSH Terms] OR ""oligospermia""[MeSH Terms] OR ""aspermia""[MeSH Terms] OR ""asthenozoospermia""[MeSH Terms] OR ""azoospermia""[MeSH Terms] OR ""teratozoospermia""[MeSH Terms] OR ("sperm""[All Fields] OR ""sperm*""[All Fields] OR ""sperm motility""[All Fields] OR ""sperm count""[All Fields] OR ""semen""[All Fields] OR ""semen""[All Fields] OR ""semen analysis""[All Fields] OR ""semen quality""[All Fields] OR ""oligospermia""[All Fields] OR ""aspermia""[All Fields] OR ""azoospermia""[All Fields] OR ""asthenozoospermia""[All Fields] OR ""teratozoospermia""[All Fields] OR ""oligozoospermia""[All Fields] OR ""oligoasthenozoospermia""[All Fields] OR ""oligoasthenoteratozoospermia""[All Fields] OR ""male fertility""[All Fields] OR ""sperm dysfunction""[All Fields] OR ""spermatogenesis""[All Fields] OR ""protamine deficiency""[All Fields] OR ""sperm parameters""[All Fields] OR ""sperm dna fragmentation""[All Fields] OR ""sperm dna damage""[All Fields] OR ""varicocele""[All Fields] OR ""non obstructive azoospermia""[All Fields] OR ""erectile dysfunction""[All Fields] OR ""sperm dna extraction""[All Fields] OR ""spermatozoa abnormality""[All Fields] OR ""sperm chromosomal abnormalities""[All Fields]))",635,12:14:52

12.2. ANEXO 2: CLASIFICACION DE LOS ARTICULOS

La clasificación de los artículos comprende 643 artículos etiquetados en las que se completaron las siguientes categorías:

Order	(internal) id	(source) id	pubmed id	keywords	abstract	title	journal	authors	First	tags (INIGO)	tags (MARIA)	tags (CRISTINA)	CONSENSO	Valor CONSENSO	silviacanudas	tags Silvia	albertsalas	tags Albert	pablo1280	tags Pablo	iarriazu	MaríaFdez	cristina.valle
-------	---------------	-------------	-----------	----------	----------	-------	---------	---------	-------	--------------	--------------	-----------------	----------	----------------	---------------	-------------	-------------	-------------	-----------	------------	----------	-----------	----------------

Tabla 3. Tabla clasificatoria. En la tabla se muestran cada una de las categorías. Los valores previos a la línea negra corresponden a la información del artículo, los valores posteriores a la clasificación

Los valores previos a la línea negra se obtienen de cada uno de los artículos, los “tags” se rellenan automáticamente al completar el cribado mediante el uso la herramienta Abstrackr. Ninguno de los miembros involucrados en la tarea de clasificación o “tags” dispuso de acceso a los mismos.

Los valores posteriores a la línea negra corresponden a los valores establecidos por los revisores. Las categorías incluyen una sección de comentarios para facilitar su clasificación. En la sección final aparecen los comentarios realizados por los miembros que clasificaron los artículos para aportar información adicional.

La tabla completa se puede encontrar en:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/11M0PmA0gSDOkpJgHzIHF32v6e3u67vbD/edit?usp=sharing&oid=115444578997681169583&rtpof=true&sd=true>

12.3. ANEXO 3: PARAMETROS DE CALIDAD

Para la clasificación de los artículos en función de los parámetros de clasificación se siguió una guía establecida por la Unidad y se modificó levemente para adecuar a los parámetros al estudio actual.

En la primera pestana se puede apreciar los resultados obtenidos, en las hojas 2, 3 y 4 se puede observar los criterios de clasificación específicos para cada uno de los tipos de artículos.

Los criterios de calidad y los resultados obtenidos se pueden consultar en el siguiente enlace:

https://drive.google.com/file/d/14_QwaQkGMEHPjpl9X0Iuql-eGUZSxhcR/view?usp=sharing