



Valor pronóstico en las tasas de recuperación para la aplicación de técnicas de preparación seminal y su evaluación en la función espermática

Gerardo Barroso,* Miguel Chaya,* Rubén Bolaños,* Yadira Rosado,* Fernando García León,* Eduardo Ibarrola*

RESUMEN

Objetivo: evaluar los índices de recuperación espermática y su movilidad total en tres diferentes técnicas de preparación seminal (gradientes de concentración, lavado seminal y *swim-up*), así como su aplicación en técnicas de reproducción asistida.

Pacientes y métodos: se evaluaron 290 pacientes al azar, de noviembre del 2001 a marzo del 2003. Para la técnica de gradientes se utilizó Isolate (alta y baja concentración), con centrifugación a 400 g, durante 10 minutos; la evaluación fue con cámara de Makler. Para la técnica de lavado espermático se utilizó HTF-M adicionado con 7.5% de sustituto de suero sintético (SSS), con centrifugación a 250 g, preparando al final 0.5 mL. En el caso del *swim-up* se utilizó HTF-M adicionado con 7.5% de SSS y se incubó durante 60 minutos a 37°C.

Resultados: las características demográficas evaluadas mediante el error estándar, límite de confianza del 95% y percentil 50 fueron similares. La aplicación de pruebas de comparación múltiple y análisis de variancia demostraron diferencias significativas en los preparados seminales pre y postcapacitación, tanto en el índice de movilidad como en la movilidad total. La tasa de recuperación fue mayor con las técnicas de gradientes y *swim-up*, en comparación con el lavado seminal. Sin embargo, las muestras con lavado mostraron conteo disminuido al inicio.

Conclusiones: las técnicas de preparación seminal son coadyuvantes en el tratamiento de la infertilidad masculina y permiten obtener mejor índice de recuperación y movilidad total espermática. No obstante, la selección de éstas depende de la adecuada evaluación seminal en forma inicial.

Palabras clave: infertilidad masculina, preparación seminal, función espermática, recuperación espermática, movilidad total espermática.

ABSTRACT

Objective: To evaluate sperm recovery and total sperm motility in three different sperm preparation techniques (density gradient, simple washing and swim-up).

Patients and methods: A total of 290 subjects were randomly evaluated from November 2001 to March 2003. The density gradient method required Isolate® (upper and lower layers). Centrifugation was performed at 400 g for 10 minutes and evaluation was done using the Makler counting chamber. The simple washing method included the use of HTF-M complemented with 7.5% of SSS, with centrifugation at 250 g, obtaining at the end 0.5 mL of the sperm sample. The swim-up method required HTF-M complemented with 7.5% of SSS, with an incubation period of 60 minutes at 37°C.

Results: The demographic characteristics evaluated through their standard error, 95% ICC, and 50th percentile were similar. The application of multiple comparison tests and analysis of variance showed significant differences between the sperm preparations before and after capacitation. It was observed a superior recovery rate with the density gradient and swim-up methods; nevertheless, the samples used for the simple washing method showed a diminished sperm recovery from the original sample.

Conclusions: Sperm preparation techniques have become very useful in male infertility treatments allowing higher sperm recovery and motility rates. The seminal parameters evaluated from the original sperm sample will determine the best sperm preparation technique in those patients who require it.

Key words: male infertility, sperm preparation, sperm function, sperm recovery, total sperm mobility.

RÉSUMÉ

Objectif : évaluer la récupération spermatique et mobilité totale dans trois techniques différentes de capacitation spermatique (gradients de concentration, lavage du sperme et *swim-up*).

Patients et méthodes : on a évalué 290 patients au hasard de novembre 2001 à mars 2003. Pour la technique de gradients on a employé Isolate (haute et basse concentration), avec centrifugation à 400g, pendant 10 minutes ; l'évaluation a été faite avec cellule de Makler.

Pour la technique de lavage du sperme on a employé HTF-M additionné avec 7.5% de substitut du sérum synthétique (SSS), avec centrifugation à 250 g, en préparant à la fin 0.5 mL. Dans le cas du *swim-up* on a utilisé HTF-M additionné avec 7.5% de SSS et on l'a fait incubé pendant 60 minutes à 37° C.

Résultats : les caractéristiques démographiques évaluées au moyen de l'erreur standard, limite de confiance du 95% et percentile 50 ont été pareilles. L'application de tests de comparaison multiple et analyse de variance ont démontré des différences significatives dans les préparations séminales pré et post capacitation, tant pour l'indice de mobilité que pour la mobilité totale. Le taux de récupération a été majeur avec les techniques des gradients et du *swim-up*, en comparaison avec le lavage du sperme. Toutefois, les échantillons avec du lavage ont montré de l'estimation diminuée au début.

Conclusions : les techniques de préparation séminale contribuent au traitement de l'infertilité masculine et permettent d'obtenir un meilleur indice de récupération et mobilité totale spermatique. Nonobstant, leur sélection dépend de l'évaluation séminale adéquate au début.

Mots-clé : infertilité masculine, préparation séminale, fonction spermatique, récupération spermatique, mobilité totale spermatique.

RESUMO

Objetivo: avaliar a recuperação espermática e mobilidade total em três técnicas diferentes de capacitação espermática (gradientes de concentração lavado seminal e *swim-up*).

Pacientes e métodos: avaliaram-se 290 pacientes de maneira aleatória de novembro de 2001 a março de 2003. Se utilizou Isolate (alta e baixa concentração) para a técnica de gradientes, com centrifugado a 400 g, durante 10 minutos. A avaliação foi feita com câmara de Makler. Para a técnica de lavado espermático se utilizou HTF-M adicionado com 7,5% de sustituto de soro sintético (SSS), com centrifugação a 250 g, preparando ao final 05 mL. Quanto ao *swim-up*, utilizou-se HTF-M adicionado com 7,5% de SSS e foi incubado durante 60 minutos a 37°C.

Resultados: as características demográficas avaliadas mediante o erro padrão, limite de confiança do 95% e percentil 50 foram similares. A aplicação de testes de comparação variada e análise de variância mostraram diferenças significativas nos preparados seminais pré e pós-capacitação, tanto no índice de mobilidade quanto na mobilidade total. A taxa de recuperação foi maior com as técnicas de gradientes e *swim-up* comparadas com o lavado seminal. Porém, as mostras com lavado apresentaram contagem diminuída no começo.

Conclusões: as técnicas de preparação seminal ajudam no tratamento da infertilidade masculina e permitem obter um melhor índice de recuperação e mobilidade total espermática. No entanto, a seleção delas depende da correta avaliação seminal no começo.

Palavras chave: infertilidade masculina, preparação seminal, função espermática, recuperação espermática, mobilidade total espermática.

Diversas publicaciones sugieren que el factor masculino representa uno de los problemas más comunes en el estudio de la pareja infértil. Los trastornos masculinos relacionados constituyen entre 30 y 40% de las causas de infertilidad, en forma aislada, en pacientes con dificultad para concebir un embarazo.^{1,2} El incremento en la demanda de atención en los centros reproductivos, así como el avance en las bases tecnológicas relacionadas con este tema han permitido mejores

posibilidades terapéuticas y de estudio y manejo de la concepción humana.¹

Conforme se observa disminución progresiva en los patrones de calidad espermática se advierte aumento exponencial en la incidencia de cáncer testicular. Este fenómeno se aprecia en forma única cuando se compara el potencial reproductivo del hombre con el de otras especies de mamíferos y cuando se manifiesta mediante una pobre expresión en los parámetros seminales.³

Sin embargo, la expresión en las características seminales puede, eventualmente, mostrar fluctuaciones a través de la vida reproductiva del hombre y no por fuerza ser indicativa de disfunción en el sistema reproductivo. Por este motivo se observan con mayor frecuencia alteraciones en los patrones de movilidad espermática y en su relación morfométrica, hasta en 50% de la población masculina con fertilidad previamente comprobada. En términos clínicos, el empobrecimiento natural del eyaculado humano refleja el papel que juega el factor masculino en el origen de la infertilidad humana, donde los defectos

* Unidad de Reproducción Asistida, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Clínica Lomas Altas, Ciudad de México.

Correspondencia: Dr. Gerardo Barroso. Unidad de Reproducción Asistida, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Clínica Lomas Altas. Paseo de la Reforma 2606, 8º piso, CP 11950, Col. Lomas Altas, Ciudad de México.

E-mail: gbarroso@clinicalomas.com.mx

Recibido: enero, 2004. Aceptado: abril, 2005.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

en la calidad seminal a menudo se definen como causales de dicha afección humana.³

El factor masculino representa entre 30 y 40% de las causas de infertilidad en forma aislada, y éste se incrementa hasta en 50% cuando se encuentra asociado con otros factores en el estudio integral de la pareja infértil. Por esta razón, el estudio andrológico es imprescindible en la enfermedad reproductiva.⁴

Son múltiples los fenómenos que se relacionan con la disminución de los parámetros de la función espermática. Uno de los primeros indicios de deterioro de la cuantificación seminal proviene del metaanálisis realizado entre 1938 y 1990, donde se incluyeron 14,947 pacientes masculinos con antecedente de fertilidad comprobada, provenientes de 61 centros independientes. En ese estudio se demostró disminución no sólo de la concentración espermática (de $113 \pm 66 \times 10^6$ mL) sino también de la calidad en los parámetros seminales.⁵

Cuando se considera una serie de covariantes potenciales (edad, tiempo de abstinencia, ubicación geográfica, etc.) la concentración espermática de la población masculina declina, aproximadamente, 2.6 millones de espermatozoides por año. En este mismo contexto, la variación en la función de las células germinales, en forma intrínseca, se manifiesta por el sorprendente incremento en la incidencia de cáncer testicular, alrededor de 2 a 4% por año en hombres menores de 50 años de edad.

A pesar de los hallazgos que sugieren deterioro de la función testicular en el hombre, los mecanismos moleculares en la enfermedad masculina no se han esclarecido por completo. La inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) como coadyuvante para las técnicas de reproducción asistida provee nuevas expectativas reproductivas en los individuos que, con una base andrológica de fondo, puedan lograrlas. Sin embargo, esto ha condicionado que con frecuencia se ignoren los fenómenos etiopatogénicos, sin contemplar el efecto en la transmisión génica de dichas alteraciones hacia su descendencia, en forma mediata o tardía.

Los progresos más importantes en el manejo de la infertilidad masculina se han conseguido en el área

de tecnologías reproductivas y de opciones de tratamiento para infertilidad masculina, que incluyen procedimientos de tipo urológico, quirúrgico, intervenciones médico-farmacológicas, así como procedimientos de reproducción asistida, tanto de baja complejidad, como la inseminación intrauterina, como de alta complejidad, que incluyen la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide.

El eyaculado humano tiene una mezcla de diversos componentes (líquido seminal, espermatozoides maduros, inmaduros, células epiteliales, etc.). Con la creciente demanda de las técnicas de reproducción asistida se ha incrementado la necesidad de obtener mejores y más efectivos preparados espermáticos que permitan aumentar la calidad de las muestras utilizadas en inseminación intrauterina y fertilización *in vitro*.^{7,8,9} El fin último es lograr que la población de espermatozoides sea morfológicamente normal y de mejor movilidad, separada del resto de los componentes que suelen interferir con su capacidad de fertilización.

Para procedimientos de reproducción asistida, la separación de espermatozoides es indispensable por dos razones importantes. La primera es remover el plasma seminal, ya que ciertas sustancias pueden causar graves daños cuando se usa en procedimientos de inseminación intrauterina; la segunda se basa en que la exposición durante un largo periodo de los espermatozoides con el plasma seminal puede decrecer su potencial de fertilización.¹⁰

A pesar de las múltiples técnicas existentes para la preparación seminal en técnicas de estudio y tratamiento en infertilidad masculina, no se ha determinado cuál de ellas ofrece el mejor valor en la aplicación de estos procedimientos. Hoy en día es necesario contar con técnicas altamente eficientes que permitan ofrecer mayores posibilidades de éxito a través de las características seminales obtenidas y que esto se refleje en el estatus reproductivo del paciente.

El objetivo de este trabajo es evaluar los índices de recuperación espermática y su movilidad total en tres diferentes técnicas de preparación seminal, así como su aplicación en las técnicas de reproducción asistida.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizaron 290 estudios seminales para capacitación espermática en el periodo de noviembre del 2001 a marzo del 2003; se utilizó la norma de procedimientos propuesta por la OMS.^{1,10,11} Las muestras seminales se obtuvieron mediante masturbación y se entregaron en un recipiente estéril. Durante la lectura inicial y el proceso de capacitación se evaluaron las siguientes características: 1) edad del paciente; 2) tiempo de licuefacción; 3) características físicas (color, viscosidad, volumen, etc.); 4) pH; 5) índice de movilidad; 6) concentración espermática (millones de espermatozoides por mililitro) y 7) índice de recuperación espermática.^{2,9,12} Todas las mediciones se realizaron por duplicado en dos cámaras de Makler, con alícuotas de 5 a 6 µL; se utilizó el criterio de motilidad de A, B, C y D.¹³ El análisis de morfología se realizó mediante el criterio estricto de Kruger, con tinción de Diff-Quik (Baxter Scientific Products).^{1,6,9,14,15}

Cada muestra se aplicó a una de las tres técnicas de preparación seminal espermática mediante inclusión al azar.

Técnicas de preparación seminal espermática

Competitividad por desplazamiento (swim-up)

La muestra se diluye 1:1 con medio de lavado fluido tubario humano modificado, complementado con 7.5% de sustituto de suero sintético (HTF-M + 7.5% SSS). Se colocan 2 mL de la dilución en diferentes tubos estériles con fondo cónico, centrifugados a 2500 XG durante 7 a 10 minutos. Posteriormente, se elimina el líquido sobrenadante y se añade al “botón espermático” (el concentrado de espermatozoides que queda en el fondo del tubo) entre 0.3 y 0.8 mL de medio de lavado, procurando que resbale por la pared para evitar la formación de burbujas y que se deshaga el botón. Los tubos se colocan con una inclinación de 45° en la incubadora o baño María a 37° durante una hora. Pasado el tiempo se colocan en forma vertical durante un minuto. Se recupera el sobrenadante del líquido de todos los tubos y se vierte en un tubo limpio, se agrega 1 mL de medio de lavado y centrifugando a 250 XG durante 5 a 7 minutos. El sobrenadante del botón se elimina. Se agregan 0.5 mL de medio de

lavado, homogenizando y se realiza el último conteo de la muestra espermática.¹⁵

Gradientes discontinuos de análisis

Se realizan las preparaciones de gradientes de Isolate (Irvine scientific, Santa Ana Ca.). Se vierten de 1 a 1.5 mL del gradiente del 90% en el fondo de un tubo cónico (gradiente de alta densidad), se dejan resbalar por la pared del tubo de 1 a 1.5 mL de la dilución del 50% (gradiente de baja densidad) y se mantiene la interfase entre las diluciones. Asimismo, se coloca 1 mL de semen y se centrifuga de 200 a 300 XG durante 10 a 20 minutos. Se forma un botón espermático, que se rescata con una pipeta Pasteur y se deposita en otro tubo limpio con 1 mL de medio de lavado y centrifugado a 200 XG durante 8 a 10 min. Se elimina el líquido sobrenadante y se resuspende con 0.5 mL de medio de lavado. La muestra se homogeniza hasta deshacer el botón.

Lavado seminal

Se diluye la muestra 1:1 con medio de lavado HTF-M + 7.5% SSS, se coloca en un tubo cónico y se centrifuga de 200 a 250 XG durante 7 a 10 minutos. Se retira el sobrenadante y se vierten 0.5 mL de medio de lavado homogenizando del botón espermático en este medio. Por último, se hace el conteo espermático.

Análisis estadístico

Se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas de evaluación de acuerdo con la distribución de la población analizada. Se efectuaron estudios de significado estadístico con el método de Kolmogorov-Smirnov, a fin de observar discrepancia entre los grupos. Se aplicó el análisis de variancia (ANOVA) y comparación múltiple con la prueba de Tuckey-Kramer para la evaluación de grupos. Todos los valores obtenidos se expresaron como media, desviación estándar, error estándar y significado estadístico, como $p < 0.05$.

RESULTADOS

La distribución por diseño de grupo se expresó de acuerdo con sus límites de confianza al 95% y percentil

50, sin observar diferencias significativas entre los grupos de estudio (cuadro 1).

La evaluación de los índices de movilidad espermática muestra diferencias en su evaluación inicial y luego del proceso de capacitación. Los gradientes de concentración tuvieron una media de 62.16 y 87.5% (figura 1) antes y después de su preparación ($p = 0.0001$).

Cuadro 1. Características demográficas por grupo de estudio en la evaluación seminal inicial

Variable	Isolate	Lavado	Swim-up
Población	148	69	73
Error estándar (EE)	0.31	0.65	0.51
IC del 95%*	32.8	31	31.2
IC del 95%**	34	33.6	33.3
Percentil 50	34	33	32

* IC límite de confianza bajo al 95%.

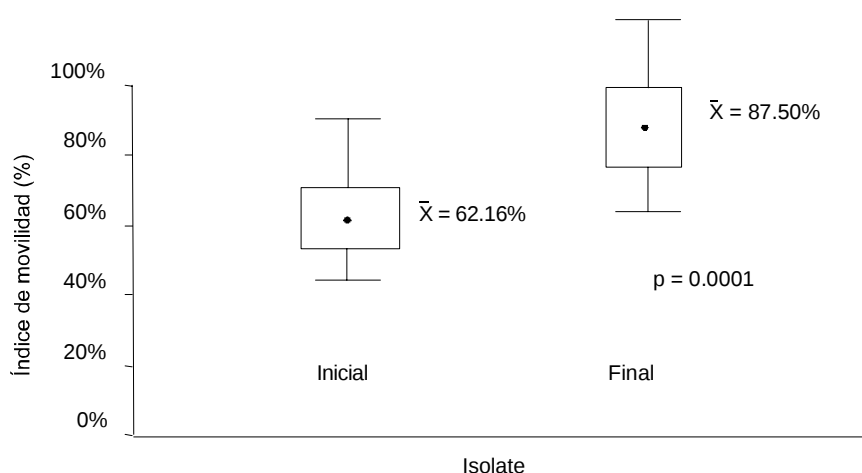


Figura 1. Evaluación analítica con el método de Kolmogorov-Smirnov

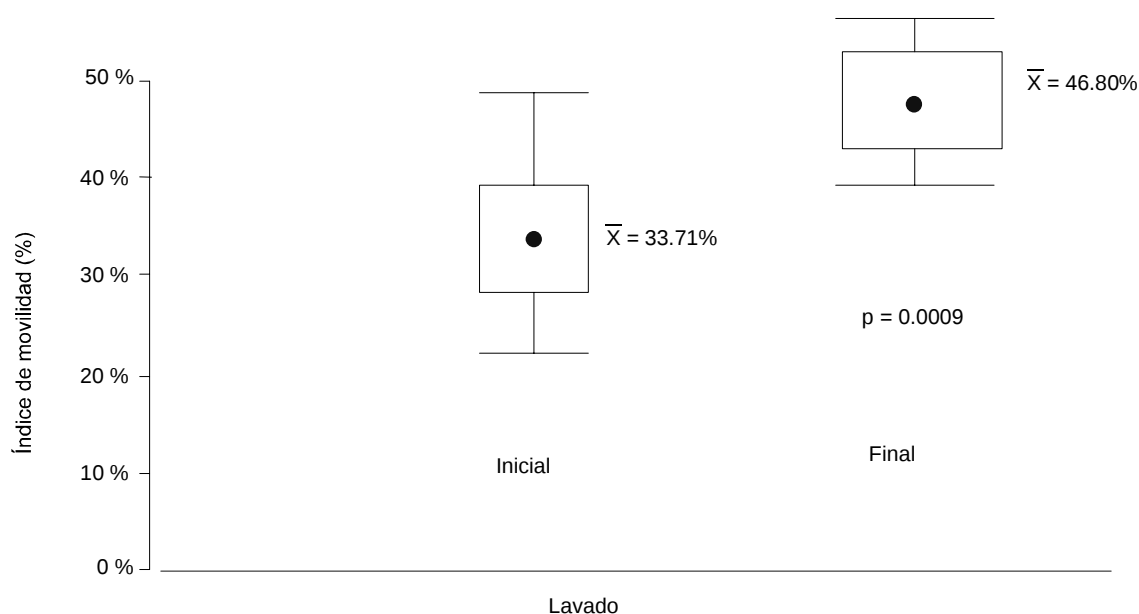


Figura 2. Evaluación analítica con el método de Kolmogorov-Smirnov.

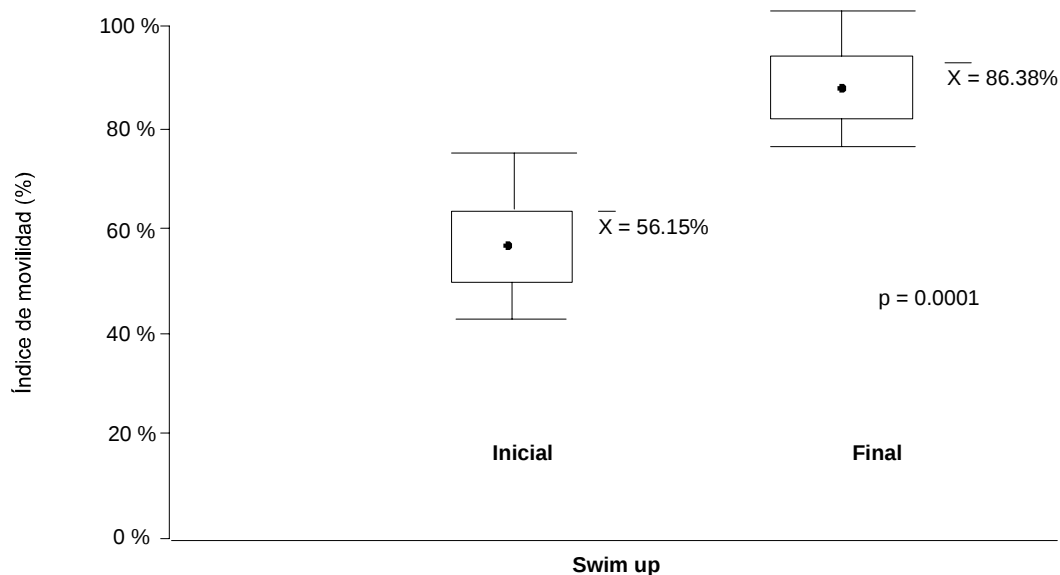


Figura 3. Evaluación analítica con el método de Kolmogorov-Smirnov.

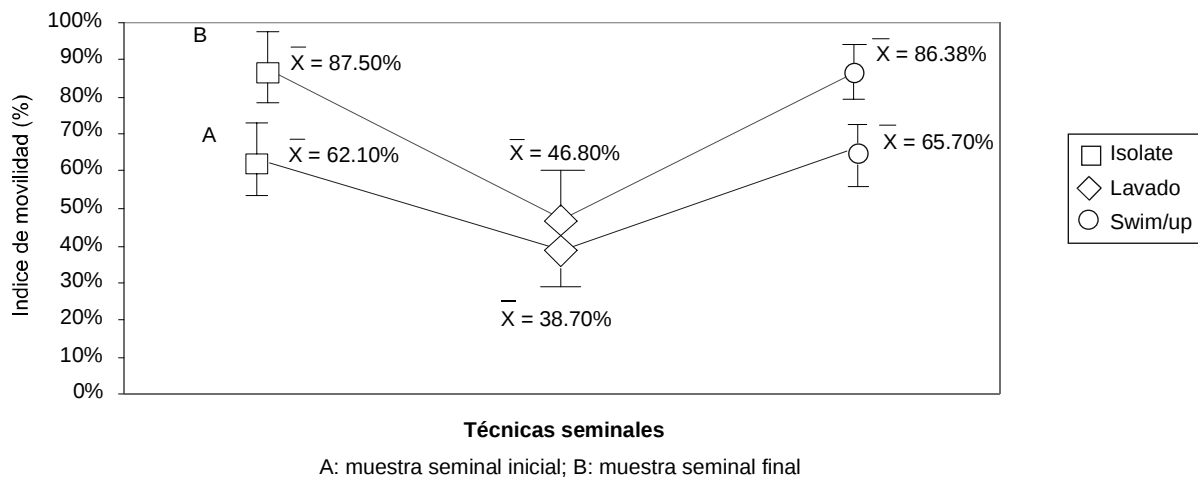


Figura 4. Evaluación por análisis de variancia (ANOVA), mediante la prueba múltiple comparativa de Tukey-Kramer. A: muestra seminal inicial; B: muestra seminal final.

Del mismo modo, se observaron diferencias en la preparación por lavado seminal [(33.7 vs 46.8%) ($p = 0.0009$)] (figura 2). En el caso de la técnica de *swim-up*, las diferenciales fueron del 56.1 vs 86.3% con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0001$) (figura 3).

Con la aplicación de métodos de comparación múltiple se encontró correlación entre cada una de las técnicas, las cuales difirieron unas de otras en sus modelos de

evaluación inicial, cuando se analizaron en su índice de movilidad (figura 4) y en su movilidad total (figura 5).

DISCUSIÓN

Es muy difícil emitir conclusiones definitivas en relación con la eficacia de distintas técnicas de preparación seminal, asociadas con las de reproducción asistida. Sin embargo, diversos estudios

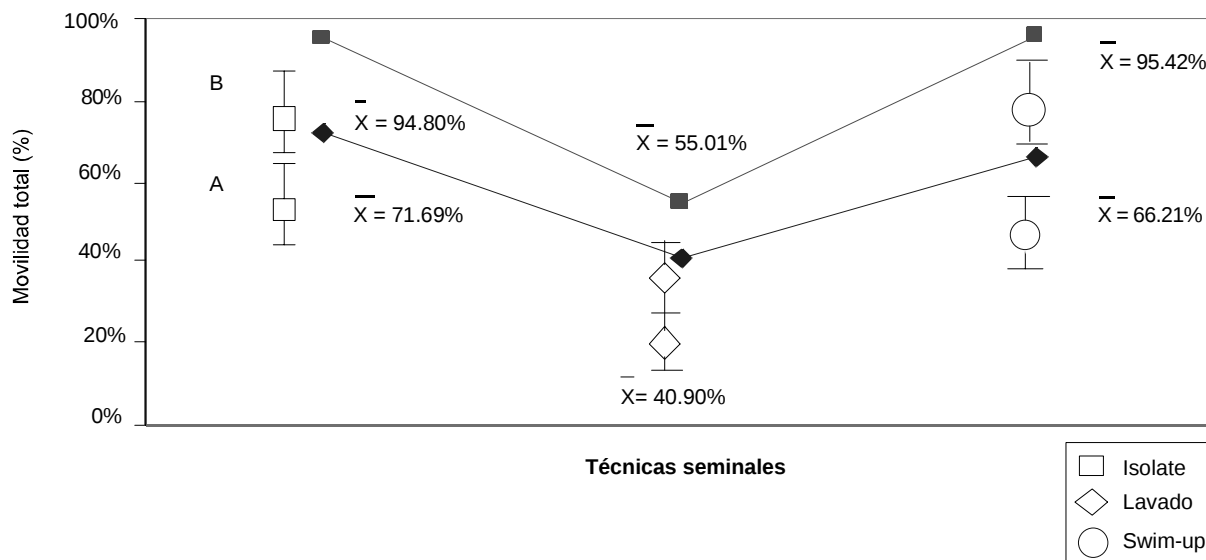


Figura 5. Evaluación por análisis de variancia (ANOVA), mediante la prueba múltiple comparativa de Tukey-Kramer. A: muestra seminal inicial; B: muestra seminal final.

prospectivos han tratado de relacionar la tasa de fecundidad con técnicas de alta complejidad e inseminación intrauterina. La evaluación en las tasas acumulativas de embarazo en ciclos de inseminación artificial para el tratamiento de la infertilidad masculina muestra, como resultado, un promedio de cuatro intentos antes de iniciar con técnicas más avanzadas, al reunir criterios de selección para este tipo de procedimientos.

Aunque existen múltiples métodos de separación de espermatozoides, a continuación se mencionan los que se utilizan con mayor frecuencia y los que proporcionan mayores índices de recuperación. Este grupo incluye el lavado simple, la migración espermática dentro de un medio de cultivo (swim-up) y la separación por gradientes de densidad.⁸

El lavado simple debe utilizarse en una muestra con baja concentración (< 20 millones) y movilidad espermática. Una muestra con células redondas y desechos no debe procesarse por este método, ya que no logra eliminar dichos compuestos de la muestra. A pesar de la baja complejidad para la preparación de esta técnica, ofrece una opción para personas con cuenta espermática inicialmente baja. Al parecer, en este estudio la tasa de recuperación no fue tan elevada como en las otras dos técnicas. Sin embargo, la pérdida

de material celular es mucho menor y permite transferir mayor número de células hacia la cavidad uterina al momento de la inseminación.

En la evaluación, la técnica de *swim-up* tuvo mayor éxito en pacientes con análisis de semen y cuantificación espermática alta (> 100 millones). No se recomienda para muestras de alta viscosidad, es decir, cuando tienen gran número de células redondas o alto contenido de desechos.⁷ Al parecer, ésta es una de las técnicas con mayor pérdida celular, donde la pureza de la muestra seminal es indispensable en técnicas de FIV.

Se propone el método de gradientes de densidad para el procesamiento de muestras con viscosidad, pero con concentración y motilidad relativamente cercanas a lo normal.⁸ Algunos autores sugieren que los gradientes tienen selección espermática con mejores características de movimiento, hiperactivación creciente y longevidad mejorada, en comparación con la técnica de *swim-up*. Además, los gradientes dieron lugar a una población espermática más normal desde el punto de vista morfológico. Varios estudios sugieren que la centrifugación por gradientes de densidad es el método más efectivo para separar morfológica y genéticamente los espermatozoides normales.⁸

Por último, es indispensable la evaluación de las diferentes técnicas de preparación seminal que ofrecen mayor posibilidad de éxito reproductivo, así como valorar la aplicabilidad y costo-efectividad de las técnicas de reproducción asistida. Por los hallazgos encontrados en este estudio, es probable que tanto la técnica de gradientes como la de *swim-up* observen una calidad seminal superior. Sin embargo, el lavado seminal puede indicarse en muestras con una concentración seminal pobre. Deberán realizarse más estudios en este rubro.

REFERENCIAS

1. Oehninger S. Strategies for the infertile man. *Sem Reproductive Med* 2001;19:231-7.
2. Trummer H, Caruso A, Lipshultz L, et al. Recent developments in the evaluation and treatment of male infertility. *Infect Urol* 2000;13:87-94.
3. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291(6510):1693-7.
4. Barroso G, Karchmer S, Kably Ambe A. Diagnóstico y tratamiento del factor masculino en la era del ICSI. *Ginecol Obstet Mex* 2000;68:204-6.
5. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;305:609-13.
6. Padrón D, Fernández LG, Gallardo RM. Interpretación del análisis seminal. 1998;9:81-90.
7. Giménez C. Estudio funcional del semen. Laboratorio de Reproducción Asistida. Barcelona: Instituto Marqués, 2003.
8. Tucker KE, Jansen CA. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. 2nd International Workshop for Embryologists: troubleshooting activities in the ART lab. Ed. R. Basuray and D. Mortimer, 2002.
9. Sharma RK, Seifarth K, Garlak D, et al. Comparison of three sperm preparation media. *Int J Fertil Womens Med* 1999;44:163-7.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucous interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
11. Barroso G, Mercan R, Ozgur K, et al. Intra-and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and manual *versus* computerized analysis. *Hum Reprod* 1999;14:2036-40.
12. Sofikitis N, Miyagawa I, Zavos PM, et al. Acrosin profiles of human spermatozoa recovered from the new SpermPrep™ II filtration column. *Tohoku J Exp Med* 1992;166:451-7.
13. Padrón DRS, Fernández LGM, Gallardo RM. Interpretación del análisis seminal. *Rev Cubana Endocrinol* 1998;9(1):81-90.
14. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human *in vitro* fertilization. *Urology* 1987;30:248-51.
15. Panayiotis MS. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim-up method. *Fertil Steril* 1992;57(6):1326-30.