

## Capacitación espermática con doble eyaculado de corto intervalo. Una alternativa en reproducción asistida

Armando Juárez Bengoa,\* Ma. de los Angeles Díaz Pérez,\*\* Maribel Sánchez Martínez,\*\*\* Xóchitl Elena Flores Escobar,\*\*\* Pedro Manuel Acosta Granado\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

En las técnicas de reproducción asistida se requiere un número mínimo de espermatozoides que algunos pacientes no pueden proporcionar con una muestra seminal capacitada. En este estudio se investigó si la capacitación espermática *in vitro* con dos eyaculados obtenidos con una hora de diferencia en pacientes con cantidades espermáticas reducidas proporciona un número adecuado de espermatozoides. Para esto se procesaron las muestras de 75 pacientes con una cuenta seminal baja, quienes proporcionaron una segunda muestra seminal después de sesenta minutos de haber proporcionado la primera. Se compararon los parámetros de la muestra capacitada del primer eyaculado (PE) con los parámetros de la muestra capacitada juntando el primero y el segundo eyaculados (PSE). Se aplicó una prueba *t* pareada considerando significativo un valor de  $p<0.05$ . La concentración, movilidad, total de células móviles (TCM) y total de células móviles con morfología normal (ICR) fue de  $31.28\pm17.65$  millones/mlilitro,  $50.45\pm26.3\%$ ,  $9.06\pm7.85$  millones y  $0.64\pm0.62$  millones respectivamente en el primer eyaculado. Los valores respectivos en el primero y el segundo eyaculados fueron  $54.45\pm35.06$  millones/mlilitro,  $59.39\pm25.41\%$ ,  $17.94\pm12.18$  millones y  $1.32\pm1.11$  millones, lo que representa un incremento significativo ( $p<0.05$ ) de 74, 17, 98 y 106%, respectivamente. Ni el volumen ( $0.49\pm0.037$  mlilitros *versus*  $0.49\pm0.019$  mlilitros, incremento 0%) ni la morfología ( $5.66\pm2.76\%$  *versus*  $6.11\pm4.88\%$ , incremento 7.9%) tuvieron cambios significativos. La capacitación espermática con doble eyaculado de intervalo corto debe ser considerada al momento de decidir la técnica reproductiva para pacientes con cantidades espermáticas limitadas.

**Palabras clave:** espermatozoide, infertilidad masculina, reproducción asistida, capacitación espermática.

### ABSTRACT

In the techniques of assisted reproduction a minimum number of spermatozoa are required, but some patients cannot provide them with one capacitated seminal sample. In this study we investigated if *in vitro* sperm capacitation of two ejaculates obtained one hour apart from patients with reduced sperm amounts provides an adequate number of spermatozoa. Samples of 75 patients with a low seminal account were processed. They provided one second seminal sample after 60 minutes from the first one. The parameters of the capacitated sample of the first ejaculate (PE) were compared with the parameters of the capacitated sample joining the first and the second ejaculates (PSE). A paired *t*-test was applied considering a significant value of  $p<0.05$ . Concentration, mobility, total of mobile cells (TCM) and total of mobile cells with normal morphology (ICR) were  $31.28\pm17.65$  million/mlilitro,  $50.45\pm26.3\%$ ,  $9.06\pm7.85$  million and  $0.64\pm0.62$  million, respectively in first ejaculate. The respective values in first and second ejaculates were  $54.45\pm35.06$  million/mlilitro,  $59.39\pm25.41\%$ ,  $17.94\pm12.18$  million and  $1.32\pm1.11$  million, which represents a significant increase ( $p<0.05$ ) of 74%, 17%, 98% and 106% respectively. Neither the volume ( $0.49\pm0.037$  mliliters *versus*  $0.49\pm0.019$  mliliters, increase 0%) nor morphology ( $5.66\pm2.76\%$  *versus*  $6.11\pm4.88\%$ , increase 7.9%) had a significant change. Sperm capacitation with double ejaculate of short interval must be considered for patients with decreased sperm amounts when deciding the reproductive technique.

**Key words:** sperm, male infertility, assisted reproduction, sperm capacitation.

### RÉSUMÉ

Dans les techniques de reproduction assistée exige un nombre minimal de spermatozoïdes que certains patients ne peuvent pas fournir un échantillon de sperme qualifié. Cette étude a examiné si, dans la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* deux éjaculés obtenus avec une différence heures chez les patients avec un nombre de spermatozoïdes réduit contient un nombre suffisant de spermatozoïdes. Pour les échantillons qui ont été traitées à partir de 75 patients avec un compte séminales bas, qui ont fourni un échantillon de sperme secondé après soixante minutes de la fourniture du premier. Nous avons comparé les paramètres de l'échantillon formé de l'éjaculat premier (PE) avec les paramètres de l'échantillon qualifiés rejoindre le premier et le second éjacule (PSE). Nous avons appliqué un test *t* apparié envisage valeur significative  $p <0.05$ . La concentration, la mobilité, le total des cellules mobiles (TCM) et le total des cellules mobiles, ayant une morphologie normale (ICR) est  $31,28 \pm 17,65$  millions / ml,  $50,45 \pm 26,3\%$ ,  $9,06 \pm 7,85$  millions et  $0,64 \pm 0,62$  millions de dollars respectivement dans la première éjaculé. Les valeurs respectives éjacule dans la première et la deuxième ont été  $54,45 \pm 35,06$  millions / ml,  $59,39 \pm 25,41\%$ ,  $17,94 \pm 12,18$  millions et  $1,32 \pm 1,11$  millions, soit une augmentation significative ( $p <0,05$ ) de 74%, 17%, 98% et 106% respectivement. Ni la taille ( $0,49 \pm 0,037$  ml *versus*  $0,49 \pm 0,019$  ml, augmentation de 0%) ou la morphologie ( $5,66 \pm 2,76\%$  *versus*

6,11 ± 4,88%, augmenté de 7,9%) ont eu des changements significatifs. La capacitation du sperme éjaculé double intervalle court terme devraient être examinés avant de décider de la technique de reproduction pour les patients avec un nombre limité des spermatozoïdes.

**Mots-clés:** le sperme, l'infertilité masculine, la procréation assistée, de la capacitation des spermatozoïdes.

## RESUMO

Em técnicas de reprodução assistida exige um número mínimo de espermatozoides que alguns pacientes não podem fornecer uma amostra de sêmen qualificada. Este estudo investigou se na capacitação espermática *in vitro* dois ejaculados obtidos com uma diferença de horas em pacientes com número de espermatozoides reduzido fornece um número adequado de espermatozoides. Para as amostras que foram transformados a partir de 75 pacientes com baixa conta seminal, que forneceram uma segunda amostra de sêmen após sessenta minutos de fornecer a primeira. Foram comparados os parâmetros da amostra treinados da primeira ejaculação (PE) com os parâmetros da amostra qualificada, a adesão à ejaculação primeiro e segundo (PSE). Foi aplicado um teste t pareado, considerando o valor de  $p < 0,05$ . A concentração, a mobilidade, o total de células móveis (TCM) e total de células móveis com morfologia normal (ICR), foi  $31,28 \pm 17,65$  milhões / ml,  $50,45 \pm 26,3\%$ ,  $9,06 \pm 7,85$  milhões e  $0,64 \pm 0,62$  milhões, respectivamente, no primeiro ejaculado. Os respectivos valores no primeiro e segundo ejaculado foram  $54,45 \pm 35,06$  milhões / ml,  $59,39 \pm 25,41\%$ ,  $17,94 \pm 12,18$  milhões e  $1,32 \pm 1,11$  milhões, representando um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 74%, 17%, 98% e 106%, respectivamente. Nem o tamanho ( $0,49$  ml ±  $0,49$  versus  $0,037 \pm 0,019$  ml, aumento de 0%) ou morfologia ( $5,66 \pm 2,76\%$  versus  $6,11 \pm 4,88\%$ , aumentou 7,9%) tiveram alterações significativas. A capacitação espermática do ejaculado curto intervalo de casal devem ser considerados ao decidir-se a técnica de reprodução para pacientes com um número limitado de espermatozoides.

**Palavras-chave:** esperma, infertilidade masculina, reprodução assistida, capacitação espermática.

**U**na vez que finaliza la espermatogénesis se inicia una serie de cambios funcionales en los espermatozoides que les permite su capacidad fertilizante. A su paso por el epidídimo, los gametos masculinos adquieren movilidad por un fenómeno de maduración, aunque hasta ese momento aún no son capaces de fertilizar al ovocito;<sup>1,2</sup> adquieren esta capacidad fertilizante durante su trayecto por el aparato reproductor femenino, en un proceso conocido como capacitación espermática,<sup>3,4</sup> caracterizada por: un cambio en la composición de la superficie membranal, incremento intracelular de calcio,<sup>5,6</sup> aumento de la concentración intracelular de adenilciclasa y adenosín monofosfato cíclico, reducción del colesterol de la membrana plasmática,<sup>7,8</sup> activación de enzimas acrosomales<sup>9,10</sup> y un movimiento flagelar en el que se observa

un batido amplio junto con un desplazamiento lateral de la cabeza, conocido como hiperactivación.<sup>11-13</sup>

Para que la fertilización pudiera reproducirse artificialmente fue necesario desarrollar un procedimiento de capacitación espermática *in vitro* con ayuda de medios de cultivo y suplementos de albúmina humana.<sup>14,15</sup> Actualmente son diversas las técnicas utilizadas para llevar a cabo la capacitación espermática *in vitro*, como lavado y resuspendido, *swim up* y separación por gradientes; el tipo de técnica depende de la calidad de la muestra seminal. Durante este procedimiento se eliminan plasma seminal, prostaglandinas, espermatozoides inmóviles y otros tipos celulares, como células inmaduras y leucocitos. Los espermatozoides viables y con buena movilidad que se obtienen con este procedimiento pueden utilizarse en las técnicas de reproducción asistida, tales como inseminación intrauterina, fertilización *in vitro* o inyección intracitoplasmática del espermatozoide, mismas que se han utilizado en los casos en que se obtienen 5 millones, 1.5 a 5 millones y menos de 1.5 millones, respectivamente.<sup>16</sup>

Debido a que se requiere un número mínimo de gametos para llevar a cabo los procedimientos reproductivos con alguna probabilidad de éxito, se han practicado algunas variantes de los tratamientos convencionales, especialmente en los pacientes en quienes no ha habido un incremento significativo de la cuenta seminal, tales como inseminaciones en dos días consecutivos<sup>17,18</sup> o el empleo de las fracciones de un eyaculado.<sup>19,20</sup> En procedimientos de fertilización *in vitro* se han utilizado dos eyaculados obtenidos en forma casi inmediata.<sup>21</sup>

\* Médico cirujano.

\*\* Química farmacéutica industrial.

\*\*\* Bióloga.

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Coordinación de Andrología.

Correspondencia: Dr. Armando Juárez Bengoa, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800 Col. Lomas de Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, México, DF. 11000, Torre de Investigación.

Correo electrónico: ajuarezbengoa@yahoo.com.mx

Recibido: diciembre de 2008. Aprobado: junio de 2009.

Este artículo debe citarse como: Juárez BA, Díaz PMA, Sánchez MM, Flores EXE, Acosta GPM. Capacitación espermática con doble eyaculado de corto intervalo. Una alternativa en reproducción asistida. Ginecol Obstet Mex 2009;77(12):550-555.

La versión completa de este artículo también está disponible en: [www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

El objetivo de este trabajo es investigar si la capacitación espermática *in vitro* con dos eyaculados, obtenidos con una hora de diferencia en pacientes con cantidades espermáticas reducidas, proporciona un número suficiente de espermatozoides al final de la capacitación para desarrollar las técnicas de reproducción asistida.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se procesaron las muestras seminales de 75 pacientes que asistieron a la clínica de Andrología y cuyos análisis previos mostraron una cuenta seminal baja (volumen seminal menor a 2 mL, concentración espermática menor a  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL, movilidad progresiva menor a 50%, morfología normal menor a 15% o total de células móviles menor a 20 millones de espermatozoides).<sup>22</sup> Se excluyeron los pacientes que en su segunda muestra no mantuvieron la alteración por la que fueron referidos al servicio de Andrología o que abandonaron su estudio. A todos se les pidió proporcionar dos muestras seminales. Éstas se obtuvieron de acuerdo con los lineamientos que marca la Organización Mundial de la Salud,<sup>22</sup> con un periodo de abstinencia de tres a seis días mediante masturbación, previa asepsia de la región genital, con espera de sesenta minutos para la obtención de la segunda muestra y manteniéndolas a 37°C en espera de la licuefacción. Se hizo un análisis seminal antes y después de la capacitación espermática, la cual se realizó con la técnica de gradientes con isolate de acuerdo con la descripción de la Organización Mundial de la Salud;<sup>22</sup> para esto se colocó de 0.7 a 1.0 mL de gradiente de alta densidad en un tubo cónico de 15 mL, se agregó lentamente 0.7 mL a 1.0 mL de isolate de baja densidad; después se agregó lentamente de 1.0 a 1.5 mL de semen diluido (V/V) con medio HTF modificado con albúmina al 5% y se centrifugó a 300 g por quince minutos. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular en 1.0 mL de medio y se centrifugó a 200 g por cinco minutos. Se separó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 0.5 mL de medio. Para muestras con concentraciones menores de 20 millones por mililitro se empleó la técnica de minigradiantes y se utilizó sólo 0.2 mL de cada uno de los gradientes mencionados.

Al paquete celular obtenido en el segundo eyaculado (SE) se le agregó el resuspendido de 0.5 mL, obtenido del primer eyaculado (PE) para obtener una sola muestra con el primero y el segundo eyaculado (PSE) que se homogeneizó

en el mismo volumen. Las muestras se evaluaron con base en los lineamientos del manual de la Organización Mundial de la Salud<sup>22</sup> y procesadas por un evaluador cuyo coeficiente de variación es menor de 10%. Se compararon los parámetros seminales (volumen, concentración, movilidad progresiva, morfología normal, total de células móviles y total de células móviles con morfología normal) de la muestra capacitada del primer eyaculado (PE) con los parámetros evaluados en la muestra que contenía las dos muestras juntas capacitadas (PSE). Se aplicó una prueba t pareada para cada parámetro mencionado y se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

El análisis seminal antes de la capacitación espermática mostró un volumen, concentración, movilidad progresiva, morfología normal y células móviles totales de  $2.04 \pm 1.74$  mL,  $44.3 \pm 30.4$  millones/mL,  $36.2 \pm 22.88\%$ ,  $5.76 \pm 3.75\%$  y  $29.49 \pm 29.49$  millones, respectivamente, en el primer eyaculado. En el segundo eyaculado los valores respectivos fueron  $1.24 \pm 1.51$  mL,  $50.73 \pm 32.29$  millones/mL,  $45.23 \pm 21.4\%$ ,  $4.96 \pm 3.37\%$  y  $24.2 \pm 24.12$  millones.

Después de la capacitación espermática se hizo el análisis seminal del producto del primer eyaculado (PE), así como del producto de los dos eyaculados acumulados (PSE); estos datos se concentran en el cuadro 1.

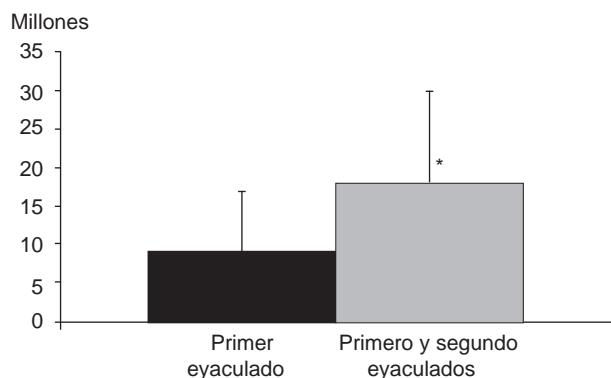
**Cuadro 1.** Parámetros seminales de las muestras procesadas para la capacitación espermática con el primer eyaculado (PE) y con la suma del primero con el segundo eyaculados (PSE). Los valores son los observados después de la capacitación. Se aplicó una prueba de t pareada.

Parámetros	Primer eyaculado (A) $X \pm DE$	Primer y segundo eyaculados (A+B) $X \pm DE$
Volumen (mL $\pm$ DE)	$0.49 \pm 0.037$	$0.49 \pm 0.019$
Concentración (millones/mL $\pm$ DE)	$31.28 \pm 17.65$	$54.45 \pm 35.06^*$
Movilidad progresiva (%) $\pm$ DE)	$50.45 \pm 26.3$	$59.39 \pm 25.41^*$
Morfología normal (%) $\pm$ DE)	$5.66 \pm 2.76$	$6.11 \pm 4.88$
ICR (millones $\pm$ DE)	$0.64 \pm 0.62$	$1.32 \pm 1.11^*$

\*  $p < 0.05$

Se observó un volumen, concentración espermática, movilidad y morfología normal de  $0.49 \pm 0.037$  mL,  $31.28 \pm 17.65$  millones/mL,  $50.45 \pm 26.3\%$  y  $5.66 \pm 2.76\%$  respectivamente en el primer eyaculado (PE). Los valores respectivos en el primero y segundo eyaculado (PSE) fueron  $0.49 \pm 0.019$  mL,  $54.45 \pm 35.06$  millones/mL,  $59.39 \pm 25.41\%$  y  $6.11 \pm 4.88\%$ .

Las células móviles totales (TCM, valor que se obtiene al multiplicar el volumen, la concentración y la fracción de espermatozoides con movilidad progresiva) fueron  $9.06 \pm 7.85$  millones (PE) y  $17.94 \pm 12.18$  millones (PSE); estos valores se muestran en la figura 1. El número de células móviles con morfología normal (ICR, valor que se obtiene multiplicando las células móviles totales por la fracción de espermatozoides con morfología normal) fue de  $0.64 \pm 0.62$  millones (PE) y  $1.32 \pm 1.11$  millones (PSE, Cuadro 1). En todos los casos se hizo una comparación de medias entre los dos grupos con una prueba de t pareada. No hubo diferencia en el volumen ni en la morfología. La concentración, movilidad progresiva, total de células móviles (TCM) y número de células móviles con morfología normal (ICR) mostraron una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Células móviles totales después de la capacitación espermática *in vitro* con el primer eyaculado (PE,  $9.06 \pm 7.85$  millones) y en la combinación del primero con un segundo eyaculado (PSE,  $17.94 \pm 12.18$  millones) obtenido sesenta minutos después. Las muestras fueron procesadas con la técnica de gradientes de isolate (\*  $p < 0.05$ ).

En los casos de las muestras que antes de la capacitación mostraron un total de células móviles inferior a 20 millones; es decir, que se mantuvieron con un conteo seminal bajo, se observó un volumen de  $1.96 \pm 1.34$  mL, concentración  $25.42 \pm 25.72$  millones/mL, movilidad progresiva  $19.34 \pm 13.77\%$ , morfología normal  $4.00 \pm 2.95\%$  y un total de células móviles de  $5.87 \pm 5.53$  millones, antes

de la capacitación espermática. Los valores respectivos después de la capacitación espermática fueron  $0.44 \pm 0.09$  mL,  $22.98 \pm 15.81$  millones/mL, movilidad progresiva  $35.74 \pm 21.90\%$ , morfología normal  $4.80 \pm 2.71\%$  y total de células móviles de  $4.25 \pm 5.43$  millones. Estos mismos valores, después de la capacitación espermática sumados los dos eyaculados, fueron de  $0.48 \pm 0.04$  mL,  $40.8 \pm 30.91$  millones/mL,  $48.88 \pm 24.39\%$ ,  $6.37 \pm 4.08\%$  y total de células móviles de  $11.16 \pm 10.78$  millones. Estos datos se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Parámetros seminales antes y después de la capacitación espermática de las muestras con menos de 20 millones de espermatozoides totales en el eyaculado. Se aplicó una prueba de t pareada.

Total de células móviles < 20 millones (n = 35)

	Pre-capacitación	Post-capacitación	Post-capacitación primero y segundo eyaculados
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Volumen (mL)	$1.96 \pm 1.34$	$0.44 \pm 0.09$	$0.48 \pm 0.04$
Concentración (millones/mL)	$25.42 \pm 25.72$	$2.98 \pm 15.81$	$40.8 \pm 30.91$
Movilidad progresiva (%)	$19.34 \pm 13.77$	$35.74 \pm 21.90$	$48.88 \pm 24.39$
Morfología normal (%)	$4.00 \pm 2.95$	$4.80 \pm 2.71$	$6.37 \pm 4.08$
Total de células móviles (millones)	$5.87 \pm 5.53$	$4.25 \pm 5.43$	$11.16 \pm 10.78$

\* $p < 0.05$

## DISCUSIÓN

La cantidad de espermatozoides requerida para llevar a cabo las técnicas de reproducción asistida se define por cada uno de los centros de reproducción de acuerdo con sus resultados. Por ejemplo, se han utilizado más de cinco millones de células móviles totales con una morfología normal mayor a 10% para realizar una inseminación intrauterina.<sup>16</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda este procedimiento cuando se obtienen 300,000 espermatozoides o más después de la capacitación.<sup>23</sup> Para un procedimiento de fertilización *in vitro*

algunos centros utilizan de 1.5 a 5 millones de espermatozoides con una morfología normal mayor a 4%,<sup>16</sup> aunque otros han reportado valores que van de 0.5 millones<sup>23</sup> a 18 millones de espermatozoides.<sup>24,25</sup> Los procedimientos de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) se han recomendado por unos grupos cuando se cuenta con menos de 1.5 millones con una morfología menor a 4%,<sup>16</sup> aunque la Organización Mundial de la Salud aconseja este método cuando se obtienen menos de 300,000 espermatozoides.<sup>23</sup>

Dado que la probabilidad de éxito con las técnicas de reproducción asistida depende de una cantidad mínima de espermatozoides con ciertas características de movilidad y morfología, debe cambiarse la estrategia en circunstancias cuando no se alcanza esa cantidad. Una alternativa es utilizar una técnica que requiera menos cantidad de células, lo que implica emplear una técnica más compleja y, como consecuencia, hacer un gasto económico mayor, o puede recurrirse a la obtención de una cantidad mayor de espermatozoides; una manera de hacer esto último es acumular las células obtenidas en más de un eyaculado.

Además, debe considerarse la variación que normalmente existe en las cuentas seminales<sup>22</sup> porque eventualmente puede disminuir la cuenta espermática, lo que cambia las expectativas si los valores de base se encuentran en zonas limítrofes para un tratamiento específico. Por ello, las muestras seminales de pacientes que tienen una cantidad reducida de espermatozoides, como es el caso de los pacientes con hipospermia o con oligozoospermia, deben someterse a una prueba de capacitación espermática y, de acuerdo con la cantidad recuperada, decidir la técnica a seguir. En los casos en los que la cuenta espermática no es suficiente para llevar a cabo una técnica menos compleja (por ejemplo, inseminación intrauterina), pueden utilizarse dos muestras seminales obtenidas en un intervalo corto y llevarla a cabo si la cantidad espermática al final de la capacitación es suficiente. Incluso en los casos en que se va a realizar una técnica más compleja, como FIV o ICSI, las muestras con dos eyaculados pueden ser convenientes para tener disponible un mayor número de espermatozoides con buena movilidad y morfología; en especial cuando la cantidad disponible de espermatozoides es muy limitada.

En este estudio no hubo diferencia en el volumen final de las muestras capacitadas con uno o con dos eyaculados, lo que indica que la técnica de preparación fue adecuada,

porque se trató de obtener la muestra con un volumen final de 0.5 mL, independientemente del número de muestras. Por otro lado, la morfología tampoco resultó diferente en las dos situaciones, lo que indica que este parámetro no se modifica con una segunda muestra. La concentración espermática se incrementa con la combinación de los dos eyaculados porque las muestras están concentradas en un mismo volumen, hecho que adquiere importancia cuando éste es uno de los parámetros que se ha considerado predictivo de embarazo.<sup>26</sup> En relación con la movilidad progresiva, ésta se incrementó con la combinación de los dos eyaculados, lo que puede ser explicado porque la cantidad de células móviles fue mayor, en promedio, en el segundo eyaculado. Estas consideraciones se aplican para el total de los pacientes, así como para el subgrupo en el que el total de células móviles (TCM) fue menor a 20 millones.

Es posible que otras variables aún no identificadas en el examen seminal convencional intervengan en el proceso, porque se ha observado una mayor tasa de fertilización *in vitro* al utilizar el segundo eyaculado<sup>27</sup> y también se ha reportado un incremento de alteraciones genéticas en hombres con cuentas espermáticas bajas y morfología anormal;<sup>28,29</sup> sin embargo, sigue empleándose el número de espermatozoides móviles para orientar el tipo de técnica a utilizar. En diversos trabajos se han empleado algunas estrategias para incrementar el número de espermatozoides disponibles.<sup>18-20</sup>

En este estudio la cantidad de células móviles totales se incrementó significativamente con la combinación de las dos muestras, hecho de gran relevancia cuando uno de los criterios para decidir el tipo de técnica reproductiva a utilizar es la cantidad de células disponibles después de la capacitación espermática.

## CONCLUSIONES

El embarazo es un fenómeno que depende de factores derivados del hombre y de la mujer. Cuando después de un tiempo no ocurre el embarazo de manera espontánea, una alternativa es recurrir a las técnicas de reproducción asistida. Estas técnicas requieren una cantidad mínima de espermatozoides viables para tener probabilidad de éxito. En los casos en los que se cuenta con una cantidad disminuida de células para llevar a cabo esas técnicas, una opción para incrementarlas es la utilización de dos

muestras seminales combinadas. En este estudio se observó que la capacitación *in vitro* de dos muestras seminales combinadas produce una muestra final con una concentración espermática más alta, mayor movilidad y un total de células móviles mayor cuando se compara con una sola muestra, diferencias que son significativas. Esto debe considerarse al decidir la técnica de reproducción en parejas infériles cuando la cantidad de espermatozoides disponibles es limitada.

## REFERENCIAS

- Chang M. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 1957;179(4553):258-9.
- Mortimer ST, Swan M, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reprod* 1998;13:2138-46.
- Rosselli M, Marchini M, Soldati G, Campana A, Balerna M. Removal of sperm-coat from human spermatozoa by interaction with cervical mucus or a capacitating medium. *Andrología* 1990;22(6):543-7.
- Eng L, Oliphant G. Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 1978;19:1083-94.
- Dragilva E, Rubinstein S, Breitbart H. Intracellular Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod* 1999;61:1226.
- Singh J, Babcock D, Lardy H. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J* 1978;172(3):549-56.
- Cross N. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;59:7-11.
- Gamzu R, Yogeve L, Paz G, Yavetz H, Lichtenberg D. Reduction of sperm cholesterol:phospholipid ratio is a possible mechanism for enhancement of human sperm binding to the zona pellucida following incubation with phosphatidylcholine liposomes. *Biol Reprod* 1997;57(3):539-46.
- Macks S, Bhattacharg A, Joyce C, Vander Ven H, Zaneveld L. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after *in vitro* decapacitation. *Biol Reprod* 1983;28(5):1032-42.
- Schill WB, Töpfer-Petersen E, Heissler E. The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum Reprod* 1988;3(2):139-45.
- Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970;23:193-6.
- Baipai M, Docel G. Involvement of tyrosine kinase and cAMP dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction* 2003;126 (2):183-95.
- Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003;125(1):17-26.
- Yanagimachi R, Chang M. Fertilization of hamster eggs *in vitro*. *Nature* 1963;200:81.
- Davis B, Byrne R, Bedigian K. Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(3):1546-50.
- Oehninger S. Strategies for the infertile man. *Sem Reprod Med* 2001;19(3):231-7.
- Makkar G, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. A comparative study of raw and prepared semen samples from two consecutive days. *J Reprod Med* 2001;46(6):565-72.
- Matlisk M, Geslevich Y, Ben-Ami M, Ben-Shlomo I, Weiner-Megnagi T, Shalev E. Two-day treatment cycles are more successful than one day IUI cycles when using frozen-thawed donor sperm. *J Androl* 1998;19(5):603-7.
- Williams CA, Newton JR. A comparison of the properties of normal and in normal and in oligospermic subjects. *Acta Eur Fertil* 1978;9(3):145-9.
- Sokol RZ, Madding CI, Handelsman DJ, Swerdloff RS. The split ejaculate: assessment of fertility potential using two *in vitro* test system. *Andrologia* 1986;18(4):380-6.
- Barash A, Laurie S, Weissman A, Isler V. Comparison of sperm parameters, *in vitro* fertilization results and subsequent pregnancy rates using sequential ejaculates, collected two hours apart, from oligoasthenozoospermic men. *Fertil Steril* 1995;64(5):1008-11.
- Manual de Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 2000. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 4<sup>a</sup>. Edición.
- Rowe P, Comhaire F, Hargreave T, Mahmoud A. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. WHO, Cambridge University Press 2000.
- Alper M, Lee G, Seibel M, Smith D, Oskowitz S, Ransil B, Taymor M. The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a program of *in vitro* fertilization. *J in vitro Fert Embryo Transf* 1985;2:217.
- Ben-Chetrit A, Senoz S, Greenblatt E, Casper R. *In vitro* fertilization outcome in the presence of severe male factor infertility. *Fertil Steril* 1995;63:1032.
- Kjaergaard N, Mortensen BB, Hostrup P, Lauritsen JG. Prognostic value of semen analyses in infertility evaluation (male fertility/life-table analysis). *Andrologia* 1990;22(1):62-8.
- Bar-Hava I, Perri T, Ashkenazi J, Shelef M, Ben Rafael Z, Orvieto R. The rationale for requesting a second consecutive sperm ejaculate for assisted reproductive technology. *Gynecol endocrinol* 2000;14(6):433-6.
- Chandley A. Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 1:45-50.
- Reijo R, Alagappan R, Patrizio P, Page D. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996;347(9011):1290-3.