

# Reunión conjunta SAMeR (Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva) - SAA (Sociedad Argentina de Andrología)

24/04/2014

Coordinadores: Mariano Perco (SAA), Gastón Rey Valzacchi (SAMeR)

Reproducción 2014;29:98-103

## Nuevos criterios de evaluación espermática según la OMS. ¿Qué cambió en el enfoque diagnóstico?

Susana Curi

Hospital de Clínicas, UBA.

El laboratorio de andrología está integrado por metodologías que tienen como objetivo aportar información diagnóstica sobre el estado de salud del aparato reproductor masculino. Como en otras disciplinas bioquímicas, toma como objeto de estudio un fluido biológico, el *semen*, producto de la secreción de glándulas con actividad exocrina y con la contribución de elementos formes celulares provenientes del epitelio germinal, de epitelios de revestimiento y de células inflamatorias. El resultado de una función eyaculatoria normal provee una muestra de semen que dependerá de la integridad anatómo-funcional del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal, de la permeabilidad de los conductos que constituyen el aparato reproductor masculino, de la función secretoria de las glándulas y finalmente de la integridad morfológica y funcional de la célula espermática.

Los métodos clínicos de laboratorio, para la evaluación de la calidad del semen, deben reunir una serie de requerimientos para ser de utilidad: tener veracidad y precisión conocida, estar validados (medir lo que se intenta medir y nada más) y se debe conocer el intervalo de referencia.

Éstos, deben ser capaces de diagnosticar el estado funcional o de desórdenes en los órganos productores del fluido, y no ser utilizados como *test* de mera predicción de fertilidad o infertilidad, ya que la paternidad no sólo es un hecho biológico,

sino social y multifactorial, que dependerá de factores orgánicos masculinos y/o femeninos, psicogénicos o combinación de éstos.

No hay razón para que los principios y reglas validadas para el estudio de otros fluidos biológicos no sean aplicadas al estudio del semen, por el contrario, el hecho de que durante algún tiempo se consideró lo inverso provocó efectos negativos que disminuyeron la calidad de la prueba.

Desde la confección de la orden médica se comienza a construir la evaluación del factor masculino en el laboratorio, dado que la selección de las pruebas requeridas para el estudio permitirá posteriormente que éste colabore en el diagnóstico clínico. Es importante destacar que la información que el médico solicitante aporte en este documento permitirá al profesional del laboratorio efectuar la correcta validación fisiopatológica y asesoramiento si fuera oportuno.

La determinación del volumen espermático constituye una prueba que requiere una adecuada precisión debido a que se constituye en una variable que no solo evaluará el aporte glandular sino que se integrará a fórmulas junto con el recuento y la morfología espermática para establecer los valores absolutos de estos parámetros. Es por ello que las últimas normativas de la OMS proponen efectuar esta medida por pesada, sugiriendo entregar al paciente el recipiente de recolección previamente pesado, para luego por sustracción calcular el volumen eyaculado. El peso de la muestra en gramos puede equipararse al volumen porque la densidad varía entre 1.043 y 1.102 g/ml.

Las tasas de fertilidad natural están ampliamente relacionadas con el número de espermatozoides con movilidad progresiva, por esa razón

su determinación cobra suma importancia en la evaluación de la muestra de semen. Actualmente el estudio puede llevarse a cabo por medio de dos métodos, el subjetivo, y el asistido por sistemas computarizados conocidos como sistemas CASA (*Computer Aided Sperm Analysis*). Siguiendo la recomendación de la estandarización OMS`2010, los movimientos espermáticos serán clasificados en tres categorías:

1. Móviles progresivos (PR). Espermatozoides con movimiento activo que desarrollan una trayectoria lineal o en grandes círculos sin considerar la velocidad.
2. Móviles no progresivos (NP). Todos aquellos patrones de movilidad con ausencia de progresión (ejemplos: movimiento en pequeños círculos o si la fuerza que produce el flagelo no desplaza la cabeza o cuando solamente se observa el batido vigoroso del flagelo).
3. Inmóviles (IM). No hay movimiento.

En previas ediciones de la OMS se diferenciaba a los móviles progresivos de acuerdo a su velocidad como rápidos, si se desplazaban a más de 25  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37°C, categorizados como grado (a) y (b) si su progresión era lenta. Sin embargo, hubo consenso internacional, documentado por los resultados provenientes de los programas de evaluación externa de la calidad, que la baja precisión y veracidad del parámetro carecía de valor clínico. Los sistemas CASA fueron desarrollados con la finalidad de objetivar el estudio de la movilidad espermática, como así también incorporar parámetros cinéticos que permitan estudiar con mayor profundidad el movimiento de los espermatozoides en las diferentes patologías y por efecto de sustancias que actúan sobre el movimiento. En la actualidad solo por este método es posible determinar el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida ya que permite medir velocidad y linealidad.

El estudio de las formas del espermatozoide consiste en clasificarlos como normales o anormales, describiendo de manera cualitativa la localización de la anomalía. Pero, ¿cómo se define la normalidad espermática? Con la finalidad de responder a esta pregunta diversos estudios se han llevado a cabo, tales como la recuperación de es-

permatozoides del tracto reproductor femenino y de la superficie de la zona pelúcida. También se efectuaron estudios de relación entre el porcentaje de formas normales y diferentes estadios de la fertilización, tiempo transcurrido en lograr el embarazo y tasa de embarazo *in vivo* e *in vitro*, lo que permitió obtener el valor pronóstico del parámetro morfología. Una de las conclusiones a las que se arriba cuando se efectúan estudios de morfología espermática en hombres fértiles e infértiles es que el rango de formas normales se extiende solo entre 0-30% para ambos. Estos valores hallados y la superposición de ambas poblaciones provocan que el valor de corte con alto valor predictivo positivo se encuentre en magnitudes muy bajas de formas normales (3-5%), tanto para fertilización *in vivo* como *in vitro*. Es también importante destacar que los Programas de Evaluación Externa revelan falta de reproducibilidad intra y entre laboratorios, que a nuestro entender colabora la incorporación del criterio estricto (considerar como anormal a los defectos mínimos) sugerido por las últimas versiones de la OMS.

El manejo clínico de los pacientes y los proyectos de investigación requieren que los parámetros reportados de un estudio del semen se expresen junto con los intervalos de referencia. La definición de población de referencia refiere a hombres sanos, sin enfermedades sistémicas, sin patología andrológica, con paternidad reciente (dentro de los últimos doce meses) o en gestación, sin antecedentes de abortos habituales y que el tiempo transcurrido entre que se suspendió la contracepción y se obtuvo el embarazo (TTP) no supere los 12 meses. Debido a que poder reclutar un mínimo de 120 individuos para poder establecer los rangos en el laboratorio es poco factible, es que se recurre a los valores establecidos por la OMS en 2010. Sin embargo, se sugiere efectuar la verificación de estos intervalos utilizando un muestreo de 20 individuos. En el transcurso del año 2011, el Laboratorio de Fertilidad Masculina de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, con la colaboración de la Sociedad Argentina de Andrología, reclutó a 20 hombres argentinos fértiles residentes en Buenos Aires en los que se pudo verificar los límites inferiores del rango (percentil 5), obtenido del estudio retrospectivo y prospectivo de Cooper y col, y sugeridos por la última versión de la OMS.

Es importante recordar que los estudios que compararon los resultados de individuos fértiles e infértiles han demostrado que ambas poblaciones presentan un alto grado de solapamiento, lo cual pone en evidencia que los resultados del semen interpretados dentro del rango obtenido por la población fértil tiene bajo valor predictivo. Cuando en estos estudios se estableció el valor de corte a través de curvas ROC, se determinó que para alcanzar una alta especificidad y valor predictivo positivo se debía establecer, por ejemplo, para las formas normales un umbral de 4% (que coincide con el percentil 2,5 de la población fértil), sin embargo, esto no establece que valores superiores a este límite deban ser considerados morfologías normales, pero sí que valores por debajo pueden ser interpretados como patológicos. De estos hallazgos se puede concluir que ni los parámetros aislados del semen ni en combinación pueden ser considerados diagnóstico de infertilidad. En nuestra opinión es aconsejable informar el límite inferior y superior (percentil 5 y 95, ver página 225 OMS'2010) dado que describe la distribución de la población y permite identificar en el percentil en que se encuentra el individuo en estudio.

**Tabla 1.** Lower reference limits (5th centiles and their 95% confidence intervals) for characteristics.

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Total sperm number (10 <sup>9</sup> per ejaculate)	39 (33-46)
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> per ml)	15 (12-16)
Total motility (PR +NP, %)	40 (38-42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31-34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55-63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3,0-4,0)

Finalmente en el informe debe constar: las características fisicoquímicas, los resultados de movilidad, concentración y morfología; y la recomendación de la OMS 2010 es informar el número total de espermatozoides con movilidad progresiva, espermatozoides vivo y espermatozoides con morfología normal como herramienta diagnóstica y pronóstica.

## Fragmentación del ADN espermático: ¿Qué sabemos al día de hoy?

Cristian Álvarez Sedó

CEGYR

Luego de realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, y basándome en nuestra propia experiencia, podemos decir que la fragmentación del ADN espermático se ha erigido como una herramienta importante para evaluar la calidad espermática. Numerosos autores han manifestado que existiría una correlación negativa entre los altos niveles de fragmentación de ADN y los resultados clínicos de los tratamientos de reproducción asistida (TRA). La fragmentación del ADN, junto con la morfología (patología espermática) y la movilidad progresiva, entre otros, podrían ser considerados como marcadores relevantes al momento de valorar el impacto del factor masculino en los resultados reproductivos.

Sobre el origen del daño del ADN se han descrito mecanismos intratesticulares y extratesticulares. En los primeros podemos destacar: apoptosis (“abortiva”), daño durante la remodelación de la cromatina en la espermiogénesis, por activación de caspasas y endonucleasas, efectos nocivos directos o indirectos por radio y quimioterapia, exposición a ciertos agentes tóxicos. Los mecanismos extracelulares principalmente ocurren en el epidídimo, y están altamente relacionados al ataque de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los factores que pueden favorecer el incremento del daño espermático son: edad avanzada, varicocele, prostatitis crónica, torsión testicular, criptorquidia, cáncer testicular, exposición al calor excesivo. Los hábitos como el tabaquismo y la ingesta excesiva de alcohol, también han sido asociados a inducir daño en el ADN espermático.

Se han descrito numerosos métodos para evaluar y cuantificar la fragmentación del ADN espermático, dentro de los cuales podemos destacar al SCSA (*sperm chromatin structure analysis*), SCD (*Chromatin dispersion test*), COMET (*electroforesis neutra*) y el TUNEL (*Terminal dUTP nick-end labeling*) como los más importantes.

La edad del varón ha evidenciado tener una correlación positiva con distintos marcadores de apoptosis (Anexina V, caspasa 3 activa), fragmentación del ADN y estrés oxidativo. Asimismo, en nuestra experiencia, y en concordancia con otros autores, la

fragmentación del ADN se correlaciona negativamente con la morfología estricta, la movilidad progresiva y la presencia de alteraciones cromosómicas.

La preparación del semen, mediante *swim-up* o gradiente de centrifugación, ha demostrado disminuir los niveles de fragmentación del ADN; sin embargo, al parecer la técnica de gradiente sería más eficiente. Es importante resaltar realizar que la incubación a 37°C durante la preparación favorece el incremento de la fragmentación. Por otro lado, la criopreservación del semen favorecería el incremento del daño del ADN mediante mecanismos de apoptosis y estrés oxidativo.

Se ha evidenciado que la fragmentación del ADN no estaría afectando las tasas de fecundación de forma significativa, siempre y cuando no estemos frente a algún caso de patología espermática severa. La detención en el desarrollo embrionario, el embarazo clínico e implantación se pueden ver afectados negativamente por altos índices de daño del ADN espermático. Sin embargo, el efecto más importante según se presenta en la literatura es el incremento en los abortos tempranos.

Finalmente, se han planteado numerosas terapéuticas frente a este problema y de acuerdo al conocimiento del origen del daño, tenemos: la biopsia de testículo, varicocelectomía, tratamiento antioxidante, etc. En otros casos, existen técnicas de laboratorio experimentales (IMSI, PICSI, Columnas de Anexina V, antioxidantes en el medio de cultivo) que hoy en día son utilizadas para disminuir los niveles de fragmentación del ADN. En base a nuestra experiencia creemos que tendría indicación de estudiarse el ADN espermático en pacientes con: morfología estricta de Kruger < 4, edad 45 años o mayor, antecedente de quimio o radioterapia, aborto recurrente, varicocele, seguimiento de tratamientos andrológicos (varicocelectomía o terapia antioxidante), exposición a alcohol, tabaco o drogas ilegales (según criterio profesional), disminución o detención del clivaje embrionario a partir de D3 en cultivos a blastocisto.

### **Enfoque actual del paciente con azoospermia no obstructiva. Cómo mejorar las posibilidades de recuperación de espermatozoides**

Raymond Osés

*Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER).*

El potencial reproductivo de los pacientes con azoospermia no obstructiva (AZNO) depende de la obtención de espermatozoides del testículo para luego realizar la inyección intracitoplasmática de los mismos (FIV/ICSI). Lamentablemente, no existe un consenso de elementos predictivos que identifiquen a aquellos pacientes con una alta posibilidad de tener espermatozoides en un procedimiento de extracción espermática. En general, la posibilidad de encontrar espermatozoides en estos pacientes es de aproximadamente 50% (la mitad de los casos) a través de una extracción testicular (TESE).

Sin embargo, en algunos casos, se han encontrado espermatozoides en el tejido testicular de pacientes sometidos a un segundo procedimiento de recuperación espermática luego de un primer procedimiento no exitoso. Esto ha llevado a varios autores a proponer un tratamiento previo para maximizar estas chances, considerando que muchos de los pacientes no están dispuestos a utilizar esperma de donante para tener hijos. Las publicaciones relacionadas y recomendaciones han tenido resultados variados, teniendo en cuenta que el número de pacientes que deberían incluirse en estudios prospectivos y randomizados para llegar a conclusiones definitivas es muy alto y difícil de lograr en la práctica clínica (muticéntrico, varios años).

El citrato de clomifeno, la gonadotropina coriónica humana (hCG) con o sin agregado de FSH o HMG y los inhibidores de la aromatasa han sido postulados para el tratamiento de hombres con AZNO y un TESE previo negativo.

El clomifeno es un agente establecido que ha sido utilizado empíricamente en casos de oligospermia idiopática a través de su acción sobre la secreción endógena del factor liberador de GnRh desde el hipotálamo, produciendo un aumento de la secreción de gonadotropinas desde la hipófisis y, secundariamente, un aumento de la concentración intratesticular de testosterona.

La hCG ha sido utilizada con el mismo propósito, incluso en pacientes con niveles elevados de gonadotropinas endógenas en sangre, sugiriendo un “reseteo” de las mismas para disminuir la hipersecreción de gonadotropinas en los pacientes con AZNO.

Los inhibidores de la aromatasa (letrozole, anastrozole), por otro lado, han sido propuestos para aquellos pacientes con defectos severos de la producción espermática y un bajo nivel de testosterona con niveles relativos altos de estradiol.

Estos tres agentes podrían ser utilizados antes de repetir el TESE en un paciente con AZNO dependiendo de los valores hormonales en sangre y siguiendo el siguiente algoritmo:

- Testosterona baja y estradiol alto (índice T/E  $\square$ 10): inhibidores de la aromataasa.
- Testosterona baja y estradiol normal (índice T/E  $\square$ 10): MSRE (clomifeno o tamoxifeno).
- Testosterona baja refractaria: hCG con o sin HMG/FSH.

Estos agentes pueden utilizarse por 2 a 4 meses antes de repetir el TESE, teniendo en cuenta que no debería realizarse antes de los 6 meses para permitir la recuperación testicular.

Realizando estos tratamientos es posible que un subgrupo de pacientes se beneficie, aunque no es posible reconocerlo de antemano.

### **Diagnóstico y tratamiento de fallas del desarrollo embrionario temprano de causa espermática. Rol del espermatozoide en el desarrollo embrionario temprano**

Rey Valzacchi Gastón

*Hospital Italiano de Buenos Aires. Procreate, Red de Medicina Reproductiva y Molecular.*

Existe un concepto generalizado en que el espermatozoide tendría un rol predominante en la fertilización, y una vez que ésta se ha llevado a cabo, es la maquinaria del ovocito la encargada de llevar adelante el desarrollo embrionario. De esta manera se ha supuesto que la técnica de ICSI (inyección espermática intracitoplasmática) permite subsanar el posible defecto de fertilización espermática y, por lo tanto, permitir el tratamiento del factor masculino. Sin embargo, en el correr de estos últimos años han aparecido fuertes evidencias del impacto espermático sobre el desarrollo embrionario. Algunas de ellas son que: a) los sémenes con teratozoospermia total tratados con ICSI presentan una tasa de implantación y embarazo muy baja, b) la baja calidad espermática se asocia con una capacidad disminuida para que los embriones obtenidos por ICSI progresen al estado de blastocisto, y c) hay hombres cuyos sémenes forman reiteradamente embriones de pobre calidad al efectuar fertilizaciones con ovocitos donados de distintas donantes, evidenciando el efecto espermático.

Si bien la FIV/ICSI es un tratamiento para el factor masculino, al permitir observar *in vitro* el proceso de fertilización y desarrollo embrionario, permite poner en evidencia algunas alteraciones espermáticas. Algunas de ellas son:

1. Fallas de activación ovocitaria por déficit del factor espermático activador del ovocito. Este factor denominado PLC $\zeta$  funcionalmente es aportado por el espermatozoide y promueve un incremento del calcio citoplasmático ovocitario, produciendo la activación de éste. La falla de este factor es causa de infertilidad, poniéndose en evidencia en la FIV o ICSI con falla de fertilización. Como alternativa terapéutica para estos casos se ha descrito la activación ovocitaria artificial con distintas sustancias, siendo la más utilizada el ionoforo de calcio, que promueve un incremento del calcio ovocitario remedando la acción de la PLC $\zeta$ .

2. Fallas en la primera división embrionaria por déficit centriolar. El espermatozoide aporta el centriolo que tiene como función organizar el huso mitótico de la primera división embrionaria. La afectación centriolar se pondrá de manifiesto en la FIV/ICSI con un proceso de fertilización normal pero con detención de los embriones en el estado de pronúcleos al no poder organizarse el huso mitótico. Se ha descrito en forma experimental la inyección de colas espermáticas donantes que podrían aportar un centriolo funcional. Algunas evidencias actuales sugieren que la disfunción centriolar podría manifestarse con alteraciones en el ritmo de las divisiones embrionarias.

3. Fallas en el desarrollo embrionario tardío debido a alteraciones en el ADN espermático. Este cuadro se pone de manifiesto luego de la activación del genoma espermático en el embrión, lo que ocurre luego de las 48-72 hs de desarrollo embrionario. De esta manera suele verse buen desarrollo embrionario hasta ese período con una disminución en la evolución al estado de blastocisto. La fragmentación del ADN espermático puede estudiarse con distintas técnicas (TUNEL, Comet, etc). Para el tratamiento de este efecto tardío se han propuesto distintas

alternativas con el fin de reducir el uso de espermatozoides con daños de ADN; algunas de ellas han sido el tratamiento con antioxidantes para reducir las especies oxigenoreactivas, como

causante de daño del ADN, el uso de espermatozoides seleccionados (morfológica –IMSI- o bioquímicamente –columnas de anexina, PIC-SI-) o el uso de espermatozoides testiculares.

**Tabla 1. Cuadros posibles**

Ovocitos	Fertilización	% embriones '72 hs	% blastocistos	Causa probable	Tratamiento potencial
Normal	↓	↓	↓	Incremento Ca	Ionóforo Ca
Normal	Normal	Normal	↓	Centrosoma	Inyección colas normales? Químico (DTT, Taxol)?
Normal	Normal	Normal	↓	Fragmentación ADN	Medicamentoso, selección espermática, BX

**HALITUS INSTITUTO MÉDICO**  
*En el inicio de la vida y después...*  
 Dir. Cient. Dr. R. Sergio Pasqualini  
 Dir. Med. Dr. R. Agustín Pasqualini (R)

**“En el inicio de la vida y después...”**

Sede Central *Marcelo T. de Alvear 2084, C1122-AAF, Buenos Aires.*  
 Sede Larrea *Larrea 1007 8°, C1117-ABE, Buenos Aires.*  
 @ info@halitus.com f halitus t @halitus

Dermatología y Estética  
*Av. Del Libertador 1080 7°C, C1112-ABN, Buenos Aires.*  
 @ dermat@halitus.com f halitusestetica t @halitusestetica

Central Única de Turnos  
 TEL. (011) 5273-2000

Sede Central  
 TEL. (011) 5273.2080  
 FAX. (011) 4963.4000

Sede Larrea  
 TEL. (011) 5273.2020  
 FAX. (011) 4963.4000

Dermatología y Estética  
 TEL. (011) 5273.2033