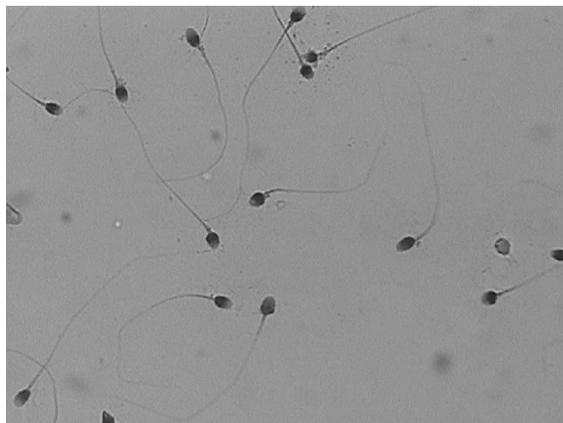
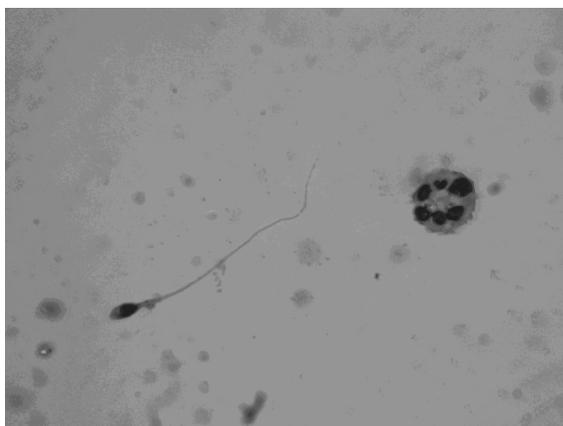


**Figura 2a.** Espermatozoides seleccionados por Puresperm y luego teñidos con la tinción de Papanicolau (100x).



dos luego de ser seleccionados mediante el gradiente, previniendo el daño generado por la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno generadas por las células blancas (figura 2b).<sup>15</sup> Los espermatozoides seleccionados por gradientes presentan menor contaminación de plasma seminal respecto de los seleccionados por *swim up*.<sup>29</sup> Respecto del *swim up* puede resultar algo más rápido, si bien su costo es superior. Los gradientes aumentan la concentración total de espermatozoides móviles asociado al aumento de la tasa de fecundación tanto en IIU<sup>50, 51</sup> como en FIV.<sup>52</sup>

**Figura 2b.** Leucocito de tipo polimorfonuclear generados de especies reactivas del oxígeno (100x).



### Gradientes vs *Swim up*. ¿Cuál elegir?

Si bien es claro que la cantidad de espermatozoides que se recupera a través de los gradientes es superior a la que se recupera post *swim up*, la capacidad fecundante de los espermatozoides evaluada *in vitro* mediante la penetración de ovocito de hámster, la inducción con fluido folicular de la reacción acrosómica y la unión a la zona, fue la misma.<sup>53</sup> Estos datos *in vitro* fueron confirmados *in vivo* en un total de 180 sémenes analizados donde se mostró que si bien la cantidad de formas normales recuperadas por gradiente fue superior respecto al *swim up*, la tasa de fecundación e implantación y embarazo no fue diferente entre grupos.<sup>54</sup> En un meta-análisis publicado en Cochrane, Boomsma y col<sup>55</sup> tampoco encontraron diferencia estadística en la tasa de embarazo ni en la tasa de aborto espontáneo cuando compararon la centrifugación, el *swim up* y los gradientes, concluyendo que aún no existe suficiente evidencia científica para sugerir cuál es el mejor método a elegir. Consideramos que esta decisión debe establecerla el laboratorio sobre la base de su demanda de procedimientos, la infraestructura con la que cuenta, su eficiencia en la recuperación de espermatozoides y el análisis de la propia experiencia.

### Separación espermática en parejas serodiscordantes para HIV

Un caso especial resulta hoy en día la consulta cada vez más frecuente de parejas serodiscordantes donde el varón resulta ser HIV positivo, mientras la mujer es negativa. La decisión de tener un hijo lleva a la necesidad de desarrollar técnicas de laboratorio que prevengan el riesgo de transmisión del virus a la mujer y al niño, y logren satisfacer el deseo del embarazo. Fue Semprini y su grupo quien en 1992<sup>56</sup> publicaron un total de 85 parejas donde el varón era HIV positivo (con mujer negativa) donde se realizaba una separación inicial mediante un gradiente de densidad seguido de *swim up*. Sus datos mostraban que había 15 embarazos sin seroconversión en las madres ni en los 10 niños nacidos. La confirmación por la reacción en

cadena para la polimerasa (PCR) de la ausencia de virus en los espermatozoides antes de la inseminación es indispensable. Muchos grupos de trabajo han presentado muy buenos resultados en series mayores de pacientes.<sup>57</sup> Sin embargo, otros trabajando sobre 107 muestras observaron que en el 94,4 % de los casos la muestra resultaba negativa para el HIV, pero que en un 5.6 % era positiva donde la IIU fue cancelada.<sup>58</sup>

### Nuevas metodologías

#### Separación magnética de células activadas (*Magnetic-activated cell sorting, MACS*):

Los espermatozoides que entran en apoptosis (o muerte celular programada) presentan productos típicos del proceso tales como activación de caspasa, disminución del potencial de la membrana mitocondrial y translocación en la membrana plasmática de fosfatidilserina. Estos espermatozoides se unen a microesferas paramagnéticas coloidales conjugadas con anexina-V y pueden ser separados al pasar a través de un campo magnético. Los espermatozoides intactos pasan libremente. Se propone separar los espermatozoides primero por un gradiente de densidad y luego una separación magnética. La población que no presenta marcadores de apoptosis sería aquella de mejor motilidad, viabilidad y formas normales con mejores posibilidades de fecundar. Dentro de la población anexina positiva donde se encuentran los espermatozoides deteriorados se encuentran aumentados los marcadores de apoptosis y el índice de teratozoospermia tiene un valor medio de 1.72 (1.6- 1.86) lo que se asocia estrechamente al DNA dañado.<sup>59, 60, 61</sup> Esta técnica de selección previa también sería útil antes de la criopreservación de espermatozoides con el fin de sólo congelar los mejores.<sup>62</sup>

#### Nuestra experiencia en el uso de técnicas de separación

Nosotros comenzamos hace más de diez años utilizando técnicas de selección espermática en Programas de baja complejidad

(IIU) tanto a nivel hospitalario como privado. Primeramente utilizamos el *swim up* y luego dada la alta incidencia que teníamos en pacientes oligo astenozoospermicos pasamos al Percoll de tres capas (90-75-50 %).

Tras la prohibición de 1996, hemos usado tanto Puresperm, Sil select o Sperm Filter, todos con similares resultados.

Sobre un grupo de 76 pacientes que consultaron al Hospital Provincial del Centenario de Rosario, encontramos que el gradiente de Percoll (90-70-50%) concentraba la cantidad de espermatozoides móviles según las características iniciales de la muestra:

Oligoastenozoospermico:  $3,94 \pm 2,4$  veces (n=7), Astenozoospermico:  $3,33 \pm 2,7$  veces (n=31), Oligozoospermico:  $2,52 \pm 1,8$  veces (n=15) y Normozoospermico:  $2,20 \pm 1,8$  veces (n=23), siendo todos los grupos significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).<sup>63</sup>

Cuando se comparó la recuperación del gradiente de Percoll vs el *swim up* ésta resultó diferente significativamente de  $2,7 \pm 2,0$  veces vs  $0,44 \pm 0,4$  veces ( $p < 0.0001$ ).

Cuando se analizó el éxito de embarazo, sobre un total de 200 pacientes que realizaron 343 ciclos de tratamiento, obtuvimos un tasa media de embarazo /paciente del  $17 \pm 3$  % (media  $\pm$  SEM) y una tasa media de embarazo/ciclo del  $10 \pm 2$  % (media  $\pm$  SEM). Todos estos procedimientos se realizaron mediante el uso de gradientes de densidad (Puresperm, SilSelect o SpermFilter) obteniéndose una media de espermatozoides móviles inseminados en los casos donde ocurrió el embarazo de  $49 \times 10^6 \pm 6$ .

No obtuvimos embarazo por debajo de 3,6 millones de espermatozoides móviles inseminados, dato comparable a los reportados por Remohí y col.<sup>64</sup> Si bien se han reportado embarazos en IIU con menos de 0,3 mill de espermatozoides móviles,<sup>34</sup> aconsejamos solicitar junto con el espermograma y el cultivo completo, un mejoramiento diagnóstico a los fines de evaluar la TRP y el número máximo de espermatozoides progresivos recuperados. Si esta cantidad es  $< 3$  millones de esperma-

tozoides progresivos desestimamos la IIU y sugerimos alta complejidad (FIV o ICSI dependiendo el caso).

Se sabe que la morfología resulta ser uno de los parámetros seminales que mejor predice las chances de éxito FIV.<sup>65</sup> Sin embargo, Lee y col<sup>66</sup> mostraron que analizando de 200 ciclos de tratamiento de IIU la morfología estricta también predecía el éxito de la IIU, ya que la tasa de embarazo era muy baja en pacientes con < 4 % de formas iniciales (3,8 %), pero era aceptable para pacientes > 4 % (de 18,8 a 29,9 %). A partir de estos datos resulta clara la necesidad de recurrir a la alta complejidad en el caso de pacientes teratozoospermicos seve-

ros < 4 % de formas normales, pero ha de ser evaluada la estrategia a utilizar en aquellos que presentan un número aceptable de espermatozoides mótils y con una morfología moderada del 5 al 13 %.

Nosotros observamos sobre un total de 203 muestras con concentración y motilidad normal según OMS (> 20 mill/ml y 50 % de progresivos, OMS 1999<sup>67</sup>) que había una clara diferencia en cuanto a la cinética de desplazamiento de los espermatozoides entre los que presentaban > 14 % de formas normales vs < 4 % (figura 3). Esto sugería que los espermatozoides de mejor forma eran los que mejor se desplazaban.<sup>63</sup>

**Figura 3.** Distribución de los datos al dividir los grupos según el % de formas normales, < 4% (n=22), entre 4 y 13% (n=89) y  $\geq$  a 14% (n=57) y compararlos tanto con: a) % RAP, % de rápidos (>25  $\mu\text{m/s}$ ); b) VAP ( $\mu\text{m/s}$ ), velocidad media promedio; c) LHD ( $\mu\text{m}$ ), desplazamiento lateral de la cabeza como con d) LIN, linealidad media (Munuce y col., 2006).

