

¿ES POSIBLE OBTENER DEL ESTUDIO DE SEMEN MEJORES PREDICTORES DE FERTILIDAD?

J.M. Montes; L. Cantú; M.E. Cánepa; J. Alciaturi; M.J. Machado; M.N. Bruné
FERTILAB - Laboratorio de Reproducción Humana - Montevideo - Uruguay

INTRODUCCIÓN

El análisis de semen estándar (espermograma) es el estudio más utilizado en la valoración paraclínica del hombre que consulta por infertilidad conyugal. Básicamente, incluye concentración, movilidad y morfología espermáticas; además agrega estudios de células redondas, rendimientos en procesamientos de selección espermática y a veces bioquímica seminal y estudios inmunológicos¹. Salvo que se encuentren compromisos muy importantes de las variables espermáticas (azoospermia, astenozoospermia total) el espermograma no ofrece una información completa de la capacidad fertilizadora de un eyaculado². Se ha indicado que el valor predictivo de un espermograma es limitado y se requieren de otras pruebas diagnósticas adicionales llamadas pruebas funcionales espermáticas³.

Una prueba funcional espermática es un análisis de laboratorio que evalúa uno o más de los procesos celulares que el espermatozoide debe cumplir en su trayecto biológico desde el abandono del plasma seminal hasta la fertilización del ovocito⁴. Teóricamente para que un espermatozoide fertilice un ovocito in vivo, debe ser capaz de completar cada uno de los siguientes pasos secuenciales: 1) nadar fuera del plasma seminal y atravesar el moco cervical en un número suficiente; 2) ser transportado a través del útero y el oviducto; 3) capacitarse; 4) nadar con un patrón alterado a través de la matriz del cúmulo; 5) ser inducido por la zona a sufrir la reacción acrosómica; 6) penetrar la zona; 7) unirse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito; 8) activar el huevo, previniendo la poliespermia; 9) ser incorporado dentro del citoplasma del huevo; 10) ser dirigido a decondensar su núcleo y formar un pronúcleo; 11) fusionarse con el pronúcleo femenino. Se hace evidente en base a esto, que el espermograma no proporciona información sobre la mayoría de estos aspectos. Por su parte una única prueba funcional es capaz de medir solo algunos de los pasos esenciales que llevan a la fertilización, por lo que se hace necesario contar con un grupo de pruebas que puedan ayudarnos a evaluar la fertilidad en su conjunto.

Se han propuesto desde hace ya algunos años varias pruebas funcionales espermáticas; entre ellas seleccionamos las siguientes en base a la bibliografía, practicidad y costos de realización de las mismas. Estas pruebas funcionales pueden ser agrupadas en:

- Prueba global de la función espermática:
Morfología espermática según criterio de Kruger (K)^{5,6}
- Prueba específica de la función espermática:
Reacción acrosómica espontánea e inducida (RA)⁷
Test de sobrevivencia espermática (TSE)⁸
Test de azul de anilina (TAA)⁹
Test de decondensación de la cromatina espontánea e inducida (TDC)¹⁰
- Pruebas inespecíficas (indirectas) de la función espermática:
Pruebas de estrés oxidativo (MOST)¹¹
Test hipoosmótico (THO)¹²

El objetivo del trabajo fue determinar el valor predictivo de diferentes pruebas funcionales sobre la tasa de fertilización comprobada durante los procedimientos de microfertilización natural (fertilización in vitro o FIV) o asistida (microinyección intracitoplasmática o ICSI) con el fin de detectar defectos espermáticos específicos y para poder tomar así mejores decisiones en el asesoramiento de la pareja infértil.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de semen y procesamiento de las mismas

Se realizaron 74 ciclos de FIV o ICSI a parejas en las cuales el rango de edades femeninas oscilaba entre 32 y 41 años y las masculinas entre 32 y 55. Para cada paciente la muestra de semen fue colectada por masturbación en recipientes estériles con 2 a 7 días de abstinencia sexual. La misma muestra que fue utilizada para los procedimientos de FIV o ICSI fue utilizada para realizar las pruebas funcionales espermáticas.

Las pruebas espermáticas K, RA, TSE, TAA, TDC, MOST, THO fueron realizadas según protocolos estandarizados^{13,14}.

La morfología espermática de Kruger, en realidad, medió de preseleccionador a la hora de decidir entre los procedimientos de FIV o ICSI: con un $K \geq 14\%$ se realizó FIV; $K \leq 5 \geq 14\%$ se realizó FIV e ICSI; $K \leq 4$ se realizó ICSI.

Procesamiento estadístico

Inicialmente, cada test espermático fue dicotomizado en “normal” y “anormal” de acuerdo a los valores de referencia específicos para cada uno de ellos, excepto para la morfología espermática según criterio de Kruger que fue también categorizado en terciles (≤ 5 , 6-9 y ≥ 10). A su vez, la dicotomización de los métodos ICSI y FIV también fue necesaria para su clasificación en “baja” y “alta” fertilización. Se consideró “alta” una tasa de fertilización $\geq 70\%$ y “baja” $< 70\%$. En forma exploratoria se hicieron tabulaciones cruzadas de cada test contra los resultados de fertilización, de los que ninguno dio diferencias significativas (resultados no mostrados), excepto el test MOST en la fertilización in vitro ($p = 0.04$).

Se planteó un criterio de análisis estadísticos bi- y multivariados en ambas modalidades de fertilización (ICSI y FIV), por medio de una regresión logística incondicional, cuyo resultado de interés era la predicción del nivel de fertilización (alto/bajo) de cada método en particular. Luego de los análisis bivariados, se ensayaron modelos multivariados de regresión con 3 y 4 tests espermáticos, a fin de establecer una orientación sobre bases estadísticas acerca de la conveniencia o no de la realización de algunos de ellos. Para ello, se estimaron: valor predictivo negativo (VPN), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo global (VP) de las combinaciones de pruebas.

RESULTADOS

En la **Tabla 1** se muestran los diferentes valores predictivos de los tests espermáticos para la fertilización por ICSI. Luego de ensayar todas las combinaciones posibles, sólo se exhiben las combinaciones que superaron aciertos globales superiores a 70%, por razones de espacio. Exceptuando (por bajo) el VPN obtenido por combinación de test de Kruger + los TDCCI y TDCSI, el resto de asociaciones de pruebas mostró valores entre 36.4 y 68.4 %. Para el VPP, donde caben las mismas excepciones citadas, los porcentajes fueron notablemente más altos, fluctuando entre 66.7 y 96.3 %. Aún más, de 15 combinaciones posibles válidas, 9 de ellas exhibieron un VPP superior a 80%, y 5 de 15 superior a 95 %. El acierto global fluctuó entre 56.5 y 78.4 %, promediando en torno a 68 %. De todas las combinaciones dobles analizadas, la asociación del test de Kruger con el MOST resultó la mejor, atendiendo a las cifras de VPP y VPN en conjunto. El añadido del test RA espontánea obtuvo un valor predictivo global superior que la combinación anterior, y un cuarto test lo mejoró levemente .

En la **Tabla 2** se muestran los valores predictivos de los tests espermáticos para la fertilización por FIV. También el análisis incluyó un ensayo de todas las combinaciones posibles, de las cuales se incluyeron en la Tabla sólo las que tuvieron un acierto global superior a 70%. Las cifras de VPN no difieren mucho en combinaciones dobles, triples o cuádruples de tests, salvo por la asociación MOST+TDCCI (con o sin el test de Kruger), que basada en un alto VPP (93.8%), un también relativamente alto VPN (66.7%) y un acierto global de 84%, aparece como la mejor de todas las combinaciones. Nuevamente el VPP en general es notoriamente más alto que el VPN, habiendo 11 de 16 combinaciones con valores superiores a 90%. El acierto global fluctuó entre 55.6 y 84 %, siendo 11 de 16 superiores al 70%, promediando en torno a 73%.

Tabla 1
VALORES PREDICTIVOS DE LOS TESTS ESPERMATICOS
(base N=47 pacientes)

PARA FERTILIZACIÓN POR ICSI

COMBINACIONES	V.P.N.	V.P.P.	V.P.G.
KRUGER/MOST/RAIN/RAES	36.36	96.15	78.38
KRUGER + MOST + RAES	57.89	92.59	78.26
KRUGER + MOST	42.11	96.30	73.91
BKRUGER + MOST	42.11	96.30	73.91
KRUGER + MOST + RAIN	42.11	96.30	73.91
KRUGER/MOST/RAIN/TAA	36.36	88.46	72.97

Tabla 2
VALORES PREDICTIVOS DE LOS TESTS ESPERMATICOS
(base N=27 pacientes)

PARA FERTILIZACIÓN POR FIV

COMBINACIONES	V.P.N.	V.P.P.	V.P.G.
MOST + TDCCI	66.67	93.75	84.00
BKRUGER + MOST +TDCCI	66.67	93.75	84.00
BKRUGER + MOST + THO	37.50	100.00	79.17
KRUGER/MOST/RAIN/RAES	36.36	96.15	78.38
BKRUGER + MOST + TAA	33.33	100.00	76.00
BKRUGER + MOST + RAIN	33.33	100.00	76.00
BKRUGER + MOST	33.33	100.00	76.00
BKRUGER + MOST + RAES	33.33	100.00	76.00
BKRUGER + MOST + TSE	25.00	100.00	73.91
KRUGER/MOST/RAIN/TAA	36.36	88.46	72.97
BKRUGER + TDCCI	63.64	75.00	70.37

Abreviatura: KRUGER = test categorizado en terciles
BKRUGER = test dicotomizado (≤ 7 , ≥ 8)

DISCUSIÓN

En relación al método ICSI, los análisis bi- y multivariados sugieren la conveniencia de utilizar siempre el test de KRUGER. Los análisis hechos en una base de 47 pacientes (sólo aquellos con un resultado conocido de ICSI), definitivamente pautan un mejor valor predictivo positivo para los tests asociados, si se los compara con los resultados de valores predictivos negativos. El KRUGER asociado a MOST resulta la mejor combinación doble (VPP=96.3%, VPN=42.1% y acierto global 73.9%). Los resultados son iguales tanto si el KRUGER se maneja por terciles como dicotomizado en la mediana (≤ 7 y > 7). La combinación de KRUGER+MOST+RA.ESP. logró un valor predictivo global mejor que KRUGER+MOST solos, y el añadido de un cuarto test mejoró levemente más el valor predictivo global. Todo ello podría sugerir el uso básico de la tríada KRUGER – MOST – R.A.ESP. para obtener una aproximación probabilística mejor, en particular si todos los test dan valores “normales” o “buenos”.

La muestra en consideración para fertilización por FIV tuvo como máximo un $n=27$. En las tabulaciones cruzadas de los diferentes tests con la FIV el mejor test fue el MOST ($p=0.04$, coef.de correlación con el % de FIV $r= 0.62$ significativo). Cuando el MOST fue normal, hubo 72.7% de FIV buena, y en un sentido inverso (aunque sólo hubo 3 casos) cuando el MOST fue anormal, los 3 casos (la totalidad) fueron FIV bajas. No hubo MOST anormal con alta fertilización. La combinación doble que surge inicialmente como mejor parece ser KRUGER+MOST, donde se alcanzó un VPP de 100% con un VPN de 33.3%, teniendo un acierto global de 76%. También la combinación MOST+TDCCI es buena, porque muestra un VPP de 93.75%, pero aumentó el VPN al doble del anterior (66.7%), logrando así un acierto global de 84%. Estos mismos resultados se lograron con la trilogía MOST+TDCCI+KRUGER. Sin embargo, una serie de triples combinaciones obtuvieron 100% de VPP, también con valores variables de VPN, pero teniendo una precisión diagnóstica global mínima de 73.9%, lo que no es malo. Lo común de esas triples combinaciones es la presencia del test de KRUGER (dicotomizado) + MOST. El añadido de una cuarta prueba diagnóstica no parece ser muy justificado.

En ambas modalidades de fertilización, los tests estadísticos sugieren una mejor capacidad predictiva positiva en general, es decir, un relativamente buen nivel de acierto de alta fertilización, que la capacidad predictiva negativa, o sea, la predicción de fracaso o baja fertilización por medio de valores bajos y esto está de acuerdo con la literatura.

Las pruebas funcionales indicadoras de viabilidad espermática como TSE y THO no se mostraron informativas en este trabajo. De hecho no aparecieron en ninguna de las combinaciones de test con VPG alto. Tal vez, estas pruebas sean mejores indicadores de fertilización in vivo que in vitro y tendrían su aplicación en los casos de factores masculinos leves donde los indicadores de penetración ovocítica (K, RA, MOST) y cromatínicos (TAA, TDC) fueran normales^{13,35}.

Entre las pruebas funcionales indicadores de penetración ovocítica, el Kruger se mostró discriminante en fertilización in vitro (FIV) como así también en microfertilización asistida (ICSI) donde mostró un VPP alto aunque el VPN fue bajo (resultado no mostrado); y esto está de acuerdo con algunos autores^{15,16,17} a pesar de que otros no encontraron tal correlación¹⁸. Todo parece indicar que la morfología espermática según criterio estricto (Kruger) es un excelente indicador de funcionalidad/disfuncionalidad espermática global o parcial¹⁹. Su asociación con otras pruebas más específicas sobre la función espermática mejoran el valor predictivo. El MOST por su parte es una prueba de lipoperoxidación forzada e informa acerca de la resistencia de la población espermática al estrés oxidativo²⁰. Nuestros resultados están de acuerdo con otros autores^{14,21,32}. Por último la RA inducida por ionóforo de calcio A23187 ha sido correlacionada con las tasas de fertilización³⁴. Se ha referido también la existencia de hombres infértiles por patología de la reacción acrosómica^{34,35}. En nuestra serie, la RA inducida no tuvo mayor incidencia en la mejora del VPG de KRUGER y MOST. Sin embargo, uno de los pacientes con KRUGER mayor de 7%, RA. inducida menor de 5% (deficitaria) y presencia de anticuerpos antiespermáticos fertilizó 3 de 7 ovocitos por FIV y 7 de 8 ovocitos por ICSI.

Los test cromatínicos que evalúan la integridad estructural, la maduración y la capacidad de decondensación de la cromatina nuclear han cobrado mucho interés tras la introducción del ICSI como tratamiento regular del factor masculino severo. Es abundante la investigación realizada al respecto en los últimos años que muestran su utilidad^{22-27,31}. En nuestro trabajo solo el TDC con inducción mostró cierto grado de discriminación pero solo para FIV. La discrepancia con los datos internacionales puede explicarse por: a) el empleo de TAA y TDC en lugar de naranja de acridina (TNA); b) los valores de referencia utilizados y c) el tamaño de la muestra considerada. Por otro lado, son muchos los trabajos recientes que dan cuenta que los test cromatínicos pueden estar evidenciando alteraciones cromosómicas espermáticas^{22-27,28,30}. Estas alteraciones cromosómicas espermáticas darían cuenta de fallas de fertilización, fallas de implantación, abortos y la posibilidad de transmitir las mismas a la descendencia. Este hecho abre un nuevo desafío para las pruebas funcionales espermáticas: cómo seleccionar mejor el espermatozoide para la microinyección²⁹.

En suma, es claro de nuestros datos y de la literatura internacional que del estudio de semen se puede extraer información adicional a la del espermograma básico que permitirá conocer mejor los diferentes aspectos que involucra la “fisiología” espermática y sus alteraciones. Parece claro también que no existe un “test” infalible de fertilidad. Por el contrario, habrá que seleccionar un grupo de combinaciones que deberá considerar aspectos técnicos y clínicos adaptados a cada caso en particular. De continuar por este camino dispondremos de enfoques andrológicos más racionales, eficientes y seguros de los que teníamos hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

1. ESHRE monographs manual on basic semen analysis. Eds. Kvist V., Björndahl L. 2002;1-4.
2. Durphy B, Neal L.M., Cooke I.D. The clinical value of conventional semen analysis. *Fert. Steril.* 1989;51:324-329.
3. ESHRE Capri Workshop. Guidelines to the prevalence of diagnosis, treatment and management of infertility. *Hum. Reprod.* 1996;11:1775-1807.
4. Muller C.H. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J. Androl.* 2000;21:10-30.
5. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S.H., Lombard C.J., Van der Merwe J.P., Van Zyl J.A., Smith K. Sperm morphology features as a pronostic factor in in vitro fertilization. *Fert. Steril.* 1986;46:1118-1130.
6. Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F., Oehninger S. Predictive value of anormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fert. Steril.* 1988;49: 112-117.
7. Cumminis J.M., Pember S.M., Jequier A.M., Yovich J.L., Hartmann P.E. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to the fertility and other seminal parameters. *J. Androl.* 1991;12:98-103.
8. Coccina M.E., Becattini C. et al. A sperm survival test and in vitro fertilization outcome in the presence of the male factor infertility. *Hum. Reprod.* 1992;7:242-247.
9. Daduone J.P., Mayaux M.J., Guilhard-Moscato M.L. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrología* 1998;20:211-217.
10. Liu D.Y., Elton R.A., Johnston W.I.H., Baker H.W. *Clin. Reprod. Fertil* 1987;5:191-195.
11. Alvarez J.G., Minaretiz D., Barret C.B., Mortola J.F., Thompson I.E. The sperm stress test: a novel test to predict pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fert. Steril.* 1996;65:400-405.
12. Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Pérez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld J.L.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 1984;70:219-228.
13. WHO: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. Cambridge University Press, Cambridge 1996.
14. Calamera J.C., Brugo Olmedo S. Manual de prácticas de laboratorio en reproducción humana 1999.
15. Montes J.M., Cantú L., Cánepa M.E., García R.B. Morphology of human sperm evaluated by stringent criteria. *Prognosis for IVF. ANTA* 1993; 4: 367-371.
16. Oehninger S., Kruger T.F. Clinical significance of sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.* 1995;10:1037-1038.
17. Grow D.R., Oehninger S., Seltman H.J., et al. Sperm morphology as diagnosed of strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil. Steril.* 1991;62:559-567.
18. Sualander P., Jakoben A. et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to strict criteria sperm morphology. *Hum. Reprod.* 1996;11:1019-1022.
19. Claassens O.E., Menkveld R., Franken D.R., et al. The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 1992;7:242-247.
20. Suleiman S.A., Elamin Ali M., Zaki Z.M.S. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility. Protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996;17:530-537.
21. Aitken R.J., Irvine D.S. Assessment of semen quality in treatment of infertility. *Treatment of infertility: the new frontiers.* Eds. Filicosi and Flamigni. *Communications media for education* 1998;97-106.
22. Bianchi P.G., Manicardi G.C., Urner F., Campana A., Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1996;2:139-144.
23. Sakkas D., Urner F., Bianchi P.G., et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1996;11:837-843.
24. Lopes S., Juriscova A., Casper R.F. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1998; 703-708.
25. Sun J.G., Juriscova A., Casper R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1997;56:602-607.
26. Esterhuizen A.D., Franken D.R., Lourens J.G., Prinsloo E., van Rooyen L.H. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum. Reprod.* 2000;15: 657-661.
27. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., et al. Utility of the sperm chromatin structure assays as a diagnostic and pronostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 1999;14:1039-1049.
28. Morel F., Mercier S., Roux C., Elmiringi T., Clavequin N.C., Bressor J.L. Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fert. Steril.* 1998;69:1122-1127.
29. Huszar G., Vigue L. The role of biochemical markers of sperm maturity in the selection of sperm for assisted reproduction. *Treatment of infertility: the new frontiers.* Eds. Filicosi and Flamigni. *Communications media for education* 1998;107-122.
30. Hofman N., Hilscher B. Quantitative studies on the corelation between disturbed chromatin condensation and sperm morphology. *Fertilitat* 1990;6:208-212.
31. Hofman N., Hilscher B. Use of aniline blue to asses chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum. Reprod.* 1991;6:979-983.
32. Sukchawen N., Keith J., Irvine D.S., Aitzen R.J. Predicting the fertilization of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fert. Steril.* 1995;63:1293-1296.
33. Coetzee K., Kruger T., Menkveld C. et al. Hypoosmotic swelling test in the predictium of male infertility. *Arch. Androl.* 1989;23:131-134.
34. Köhn F.M., Schill W.B. Andrological approach in assisted reproduction. *Manual on assisted reproduction.* Eds. Rabe, Diedrich and Runnebaum. *Sprufer* 1997;419-421.
35. Nuñez Calonge R., Nuevos conceptos en la valoración de la función espermática. *Temas de actualidad en andrología.* Tomo 1. Eds. ASES, 1999;123-164.