

Los parámetros espermáticos funcionales como factor pronóstico en ICSI: experiencia de la ciudad de Medellín.

Estudiante

Luisa Fernanda Calderon Mendoza

Director

Walter Dario Cardona Maya, Bact, MSc, PhD
Universidad de Antioquia

Trabajo de Grado

Maestría en Ciencias Biológicas

Línea de Investigación en Biotecnología

Universidad CES, Universidad EIA

Medellín

Octubre 2017

Tabla de contenido

Introducción general	3
Artículo 1: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, treinta años después de su implementación.....	8
Artículo 2: Los parámetros espermáticos funcionales como factor pronóstico en ICSI: experiencia de la ciudad de Medellín.....	23
Artículo 3: Calidad seminal e inseminación intrauterina: Estudio retrospectivo.....	40
Conclusiones generales	56
Perspectivas	57
Referencias bibliográficas	58
Anexos	62

Introducción general

La infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo, caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección o debido a un impedimento de la capacidad de una persona para reproducirse (Fernando Zegers-Hochschild et al., 2017). Así mismo, la infertilidad puede surgir de factores masculinos, factores femeninos o una combinación de estos e incluso tener un origen desconocido (Lindsay & Vitrikas, 2015).

En lo que se refiere al factor masculino, se conoce que está presente en alrededor del 50% de los casos, con responsabilidad exclusiva en el 30% y agregado a un factor femenino en el 20% restante (Winters, Gannon, & Walsh, 2015). La fertilidad masculina depende de la producción y transporte de los espermatozoides, un proceso muy complejo que involucra los sistemas endocrino, inmunológico y neurológico, y por lo tanto, valorar el potencial de fertilidad de la pareja masculina representa una parte importante en la evaluación de una pareja que no ha logrado el embarazo (Katz, Teloken, & Shoshany, 2017). Esta evaluación debe realizarse simultáneamente con la mujer, pero no se realiza en al menos el 18% de los casos (Eisenberg et al., 2013). Al no realizar una evaluación completa del paciente, uno no sólo compromete el pronóstico de fertilidad de la pareja, sino que también pierde la oportunidad de mejorar los resultados de salud en los pacientes masculinos (Katz et al., 2017).

El diagnóstico del hombre tiene como objetivo identificar los factores que influyen en la infertilidad, ofrecer un asesoramiento adecuado y también las mejores opciones de tratamiento, ya sea para aumentar las posibilidades de una concepción tanto espontánea como por técnicas de reproducción asistida (TRA) (Kliesch, 2014). La evaluación del hombre se basa específicamente en el análisis del semen de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), con valores de referencia estudiados (WHO, 2010). Estos valores de referencia se fundamentan en los resultados de un estudio prospectivo multicéntrico mundial en 1941 hombres que embarazaron a la pareja en un período de observación de 12 meses y los límites inferiores de referencia indicados corresponden al percentil quinto, límite inferior de referencia (WHO, 2010). En general, el análisis estandarizado del semen comprende volumen, pH, concentración espermática, recuento total de espermatozoides, movilidad espermática, morfología espermática, vitalidad espermática, concentración de células redondas y leucocitos.

Sin embargo, los resultados del análisis del semen no reflejan necesariamente la capacidad fertilizante de los espermatozoides. En caso de oligozoospermia severa, se deben buscar causas genéticas y las posibilidades de mejora pueden ser limitadas; en caso de infecciones, el tratamiento puede mejorar los parámetros y la función de los espermatozoides; y en particular, para pacientes con infertilidad de origen desconocido, se han desarrollado pruebas adicionales de la función

espermática para conocer con más detalle la causa de la infertilidad (Kliesch, 2014).

Las pruebas funcionales son un conjunto de exámenes especializados que evalúan aspectos funcionales de los espermatozoides y parecen estar más relacionados con el potencial fértil del hombre (Oehninger, Franken, & Ombelet, 2014; Samplaski, Agarwal, Sharma, & Sabanegh, 2010). Estos permiten: el diagnóstico específico de disfunciones espermáticas, la predicción de tasas de fecundación y embarazo y la indicación de tratamientos adecuados para la disfunción identificada (Franken & Oehninger, 2012). Al tener un diagnóstico, el especialista establecerá el tratamiento adecuado para lograr el embarazo en la pareja.

Uno de los tratamiento de alta complejidad es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la cual consiste en la inyección de un solo espermatozoide dentro del citoplasma del oocito (G. Palermo, Joris, Devroey, & Van Steirteghem, 1992). Actualmente, se encuentra disponible en un gran número de centros de reproducción asistida incluso en Colombia, lo cual ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad por factor masculino (Meniru, 2004). El uso de la ICSI como técnica de rutina, generó como consecuencia la introducción de procedimientos para la recuperación de espermatozoides desde el epidídimo o directamente de los testículos, por lo que actualmente, todo el espectro de la infertilidad masculina se puede tratar (Elder, K & Dale, 2011).

Esta técnica está indicada para parejas en donde el factor masculino está presente como una de las causas de infertilidad, es decir, morfología anormal, baja concentración de espermatozoides y mala movilidad. Adicionalmente, se debe utilizar cuando se recuperan espermatozoides por medio de biopsias testiculares, en casos de azoospermia y vasectomía (G. D. Palermo, Neri, & Rosenwaks, 2015). Sin embargo, en la actualidad, el uso de la ICSI en pacientes con parámetros seminales en el límite inferior de referencia o incluso normales respecto a los reportado en 2010 por la OMS, es común en los laboratorios de reproducción asistida (Babayev, Park, & Bukulmez, 2014), e incluyen otras indicaciones como: infertilidad inexplicada, oocitos de mala calidad, bajo número de oocitos, edad materna avanzada, fallos en fertilizaciones anteriores y fecundación de oocitos criopreservados (Fauser et al., 2014).

Lo anterior, se ve reflejado en los datos obtenidos en el año 2011 y publicados en 2014 por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), en los que informan que se realizaron 1.5 millones de ciclos de reproducción asistida en todo el mundo y que la técnica más utilizada para la fecundación de los oocitos es la ICSI, representando alrededor de dos tercios de los tratamientos de reproducción asistida por encima de la FIV convencional que representa el tercio restante (Kupka et al., 2016). Así mismo, en 2013 se realizaron 35.089 ciclos en Latinoamérica, de los cuales en el 84.7% de los casos se utilizó el ICSI para la fecundación de los oocitos (Fernando Zegers-Hochschild, Schwarze, Crosby, Musri, & Do Carmo Borges De Souza, 2015). Esta preferencia se debe

fundamentalmente para evitar el fracaso de la fecundación (Neri, Lee, Rosenwaks, Machaca, & Palermo, 2014; The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine, 2012).

De esta manera, el uso extensivo de este procedimiento, se debe al alto nivel de estandarización y a la eficacia que ha sido demostrada recientemente (Rubino, Vigano, Luddi, & Piomboni, 2015), debido a que ha alcanzado resultados comparables con la FIV y adicionalmente puede superar las disfunciones espermáticas (G. D. Palermo et al., 2015).

Planteamiento del problema

La infertilidad está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la incapacidad de una pareja para lograr una concepción o llevar un embarazo a término después de un año de relaciones sexuales regulares sin protección (F. Zegers-Hochschild et al., 2009), se estima que más de 70 millones de parejas en el mundo son infértiles (Lopez, Urbano, & Cardenas, 2012). Aproximadamente, el 30% de los casos de infertilidad se deben exclusivamente al factor masculino (Kumar & Singh, 2015) de los cuales gran parte se tratan mediante algún tratamiento de reproducción asistida entre los que se incluye la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

El ICSI es un procedimiento en el cual se introduce artificialmente un espermatozoide dentro del oocito utilizando una pipeta de microinyección (Palermo, Gianpiero. Neri, Queenie. Takeuchi, Takumi. Hong, Simon. Rosenwaks, 2009) y está indicado en parejas infértiles en las que se detectan anomalías en los parámetros seminales (G. Palermo et al., 1992). Su éxito depende directamente de la calidad del oocito y del espermatozoide que se utilicen. Actualmente, para establecer la calidad de los espermatozoides, se realiza un espermograma, una valoración de los parámetros seminales convencionales bajo los lineamientos propuestos por la OMS en 2010 en los que se incluyen la concentración, la movilidad y la morfología, entre otros (WHO, 2010), y es considerado como el punto de partida en el diagnóstico de la infertilidad masculina (Lopez et al., 2012). Sin embargo, esta evaluación no tiene un alto valor predictivo en los resultados de los tratamientos de reproducción asistida debido a que no discrimina de manera eficiente entre muestras normales y anormales (Hughes, Grantmyre, & Zini, 2015). Por lo tanto, para esclarecer con mayor precisión el efecto de la calidad de los espermatozoides en las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y en el embarazo, surgen los parámetros funcionales tales como la integridad de la membrana, la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la integridad del ADN espermático, entre otras, que evalúan los gametos masculinos a nivel estructural, funcional y molecular, los cuales han adquirido gran importancia, debido a que podrían brindar más información asociada al éxito de las técnicas de reproducción asistida (Oehninger et al., 2014).

Dado que tradicionalmente se clasifican las muestras aptas para ICSI de acuerdo a los parámetros de evaluación seminal sugeridos por la OMS y que estos no logran predecir con precisión los resultados finales de los tratamientos de alta complejidad, los cuales generalmente son relativamente bajos, se hace necesario implementar nuevas técnicas, más informativas y con mayor resolución que permitan hacer un mejor diagnóstico sobre la calidad de los espermatozoides que serán sometidos a ICSI.

Objetivo

Evaluar la relación que existe entre los parámetros seminales convencionales y funcionales, con las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo obtenidas por ICSI.

Resultados en formato de manuscritos

Durante la maestría se prepararon tres manuscritos, dos de los cuales fueron aceptados y publicados y el otro será sometido a la revista Biomédica.

El primero artículo, fue una revisión de literatura sobre la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en el cual se habló desde los aspectos técnicos hasta de su utilidad e importancia clínica. El ICSI es un procedimiento que se usa de manera rutinaria en los centros de reproducción asistida, con tasas de fecundación y embarazo comparables con la FIV convencional, y adicionalmente tiene la ventaja de tratar el factor masculino presente.

Calderón-Mendoza LF, Cardona-Maya WD. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, treinta años después de su implementación. Medicina & Laboratorio 2015; 21: 431-444.

En el segundo artículo, se incluyó la propuesta de trabajo teniendo en cuenta la revisión anterior y la pregunta de investigación que surge de las tasas de embarazo subóptimas y el rol poco conocido del factor masculino en los tratamientos de reproducción asistida.

Los parámetros espermáticos funcionales como factor pronóstico en ICSI: experiencia de la ciudad de Medellín. **Calderón-Mendoza LF**, Castrillón López L, Vélez Giraldo CF, Isaza Álvarez V, Cardona-Maya WD. Biomédica. por someter.

Finalmente, surgieron múltiples dudas, una de éstas fue conocer el valor pronóstico de los parámetros seminales en la inseminación intrauterina, debido a que en la investigación central estudiaríamos estos parámetros en tratamientos de alta complejidad. Por lo tanto, realizamos un estudio retrospectivo con datos de

inseminaciones hechas en Concevidas. Esto es de gran importancia, ya que en nuestro centro realizamos una cantidad considerable de tratamientos de baja complejidad, no sólo por la tasa de embarazo aceptable obtenida sino también por la conveniencia de los pacientes.

Calidad seminal e inseminación intrauterina: Estudio retrospectivo. **Calderón-Mendoza LF**, Castrillón López L, Vélez Giraldo CF, Cardona-Maya WD, Isaza Álvarez V. Urología Colombiana. 2017, *in press*

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, treinta años después de su implementación

Intracytoplasmic sperm injection, thirty years after its implementation

ARTÍCULO 1

Luisa F. Calderón-Mendoza Biol¹, Walter D. Cardona-Maya PhD²

Resumen: la infertilidad es una enfermedad que se caracteriza por la imposibilidad de lograr un embarazo después de más de 12 meses de relaciones sexuales; como consecuencia, existen tratamientos para manejar este trastorno. Uno de los tratamientos de reproducción asistida es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la cual fue implementada en 1992 para tratar parejas con el factor masculino asociado a la causa de infertilidad. Actualmente, esta técnica es indicada para la infertilidad sin causa aparente, fallas anteriores en los procesos de fertilización in vitro, edad materna avanzada, oocitos de mala calidad, entre otros. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides comienza con una estimulación ovárica controlada mediante gonadotropinas y la aspiración folicular para obtener los oocitos. Simultáneamente se procesa la muestra de semen y posteriormente se realiza la microinyección del espermatozoide elegido al interior del oocito. Por otro lado, los parámetros seminales y funcionales han adquirido gran importancia debido al papel determinante en el éxito de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, especialmente la integridad del ADN espermático. Finalmente, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides permite que los pacientes con alteraciones seminales tengan la posibilidad de concebir un hijo biológico. En esta revisión se describen los fundamentos de esta técnica y su relación con los parámetros seminales y la fertilidad.

Palabras clave: inyecciones de esperma intracitoplasmáticas, fertilidad, análisis de semen, técnicas reproductivas.

Abstract: Infertility is a disease characterized by the inability to achieve pregnancy after more than 12 months of sexual intercourse; as a result, there are treatments to manage this disorder. One of the treatments of assisted reproduction is the intracytoplasmic sperm injection (ICSI), which was implemented in 1992 to treat couples with male factor associated with the cause of infertility.

¹ Bióloga, estudiante de Maestría, Universidad CES, Centro de Medicina Reproductiva CONCEVIDAS. Medellín, Colombia

² Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, PhD en Biología. Docente Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Laboratorio 534, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co/wdcmaya@gmail.com

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses

Medicina & Laboratorio 2015; 21: 431-444

Módulo 27 (Salud Sexual y Reproductiva), número 5. Editora Médica Colombiana S.A. 2015®

Recibido el 03 de septiembre de 2015; aceptado el 15 de octubre de 2015

Currently, this technique is indicated to unexplained infertility, previous in vitro fertilization failures, advanced maternal age, poor quality oocytes, among others. Intracytoplasmic sperm injection begins with a controlled ovarian stimulation and follicular aspiration to obtain oocytes. Simultaneously the semen sample is prepared and the microinjection of the selected spermatozoa into the oocyte is performed. On the other hand, the seminal and functional parameters have become very important due to the determinant role in the success of the intracytoplasmic sperm injection, especially sperm DNA integrity. Finally, intracytoplasmic sperm injection allows patients with seminal alterations have the possibility to conceive a biological child. In this review, the basics of this technique and its relationship with sperm parameters and fertility are described.

Keywords: Intracytoplasmic sperm injections, fertility, semen analysis, reproductive techniques.

Calderón-Mendoza LF, Cardona-Maya WD. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, treinta años después de su implementación. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 431-444.

La infertilidad es una enfermedad que se caracteriza por la imposibilidad de lograr un embarazo después de más de 12 meses de relaciones sexuales sin protección en los días fértiles [1], que acarrea consecuencias emocionales y psicosociales para las parejas [2]. Una vez transcurrido este tiempo sin concebir es necesario consultar a un especialista y optar por el tratamiento más adecuado para tener un hijo vivo sano en casa. Existen diferentes tipos de tratamientos de reproducción asistida que se aplican a las parejas clasificados según su complejidad (baja y alta complejidad) cada una con un porcentaje de éxito diferente. En la categoría de baja complejidad se encuentran las relaciones sexuales dirigidas o coito programado y la inseminación intrauterina, y en la de alta complejidad la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (véase [tabla 1](#)).

Tabla 1. Tasas de embarazo de las Técnicas de Reproducción Asistida			
Tratamiento		Porcentaje de éxito (%)	Ref
Baja complejidad	Relaciones sexuales dirigidas	5*	[3]
	Inseminación intrauterina	10-20	[4]
Alta complejidad	Fertilización <i>in vitro</i>	33	[5]
	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	32	[5]
*Tasa de embarazo del coito programado acompañado de hiperestimulación ovárica controlada			

Las relaciones sexuales dirigidas o coito programado constituyen el primer paso para el manejo de la infertilidad y se recomienda a parejas que presentan infertilidad de origen desconocido y a mujeres jóvenes. El momento de las relaciones sexuales es determinado por el pico endógeno de la hormona luteinizante (LH), debido a que la ovulación se produce 24 horas después de la detección de este incremento. Sin embargo, lo más común es realizar un seguimiento ecográfico del desarrollo folicular; además, se puede realizar una estimulación ovárica específicamente en mujeres con anovulación [6].

La inseminación intrauterina es el tratamiento de primera elección para parejas infértiles, que consiste en depositar espermatozoides móviles en el útero mediante un catéter durante el período ovulatorio con el objeto de lograr un embarazo. Esta técnica está indicada en mujeres con al menos una trompa de Falopio permeable y cuyas parejas tienen una muestra de semen

origen obstructiva es posible recuperar los espermatozoides por medios quirúrgicos, como la aspiración del epidídimo y la biopsia del tejido testicular. Incluso, en hombres con azoospermia no obstructiva es posible recuperar espermatozoides del eyaculado hasta en un 35% de los casos [16], después de una búsqueda minuciosa en el precipitado obtenido al centrifugar la muestra de semen (1.600 rpm/10 min) o después de una biopsia testicular. Generalmente, la calidad morfológica de los espermatozoides recuperados en estos pacientes es baja; sin embargo, el efecto de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es tan alto que se han logrado obtener tasas de fecundación y de embarazo aceptables a pesar de estos inconvenientes [17,18]. Además, se ha observado que el éxito de la fecundación durante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en individuos con oligoastenoteratozoospermia es 3,9 veces mayor que si se usara la fertilización *in vitro* [19].

Actualmente, el uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en pacientes con parámetros seminales en el límite inferior de referencia, o incluso normales respecto a los reportados en 2010 por la Organización Mundial de la Salud [12], es común en los laboratorios de reproducción asistida [20] e incluye otras indicaciones para evitar una baja fecundación de los oocitos como: infertilidad inexplicada, oocitos de mala calidad, bajo número de oocitos, edad materna avanzada, fallos en las fertilizaciones *in vitro* y fecundación de oocitos criopreservados o vitrificados [21]. La razón fundamental para todas estas indicaciones es evitar el fracaso de la fecundación [10]; sin embargo, no existe evidencia científica que justifique el uso rutinario de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides sin indicaciones bien establecidas [20,21].

Así mismo, la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides y en general los tratamientos de reproducción asistida han sido objeto de estudio para conocer su seguridad. Se conoce que la tasa de malformaciones congénitas de niños concebidos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en comparación con aquellos concebidos naturalmente no es estadísticamente significativa. Entretanto, los riesgos asociados a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides más relevantes son los embarazos múltiples y el bajo peso al nacer; sin embargo, el subsecuente desarrollo y crecimiento de estos niños es normal [22].

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides: procedimiento complejo

Uno de los factores determinantes del éxito de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es el uso de los instrumentos correctos, entre los que se encuentran un microscopio invertido con contraste de fase equipado con un sistema de contraste de modulación Hoffman y una platina calentadora para mantener los gametos a la temperatura corporal, mientras se encuentran fuera de la incubadora. Además, el microscopio debe tener acoplado el equipo de micromanipulación que consiste en soportes para las pipetas a cada lado, unidos por un tubo de teflón a los microinyectores, los cuales proporcionan fuerzas de succión y expulsión controladas. Las pipetas son de vidrio y tienen características específicas: una tiene extremos romos y se utiliza para sujetar el oocito mientras que la otra es afilada para permitir la inyección del espermatozoide. De otro lado, se encuentran los micromanipuladores para los movimientos bruscos de las pipetas y para los movimientos finos teniendo en cuenta que se pueden mover rápido o lento en varias direcciones: arriba, abajo, adelante, atrás, a la izquierda, a la derecha y

con un recuento espermático mayor a tres millones de espermatozoides móviles progresivos recuperados [4,5]. Generalmente, este proceso se realiza acompañado de una estimulación ovárica controlada con dosis de gonadotropinas bajas (75 UI a 112,5 UI) para obtener el desarrollo de varios folículos y así aumentar la probabilidad de embarazo [3,5].

Por otro lado, la fertilización *in vitro* fue diseñada inicialmente como tratamiento para la infertilidad asociada a la patología tubárica bilateral. No obstante, en la actualidad, tiene una amplia variedad de indicaciones como la infertilidad por factor masculino no grave, los fallos de la inseminación intrauterina (se recomienda realizar hasta cuatro intentos [4]), la disfunción ovárica y la endometriosis, entre otros [7,8].

Finalmente, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es uno de los tratamientos reproductivos más utilizados en la actualidad, implementada en 1992 [9] con el fin de mejorar la fecundación de los oocitos en parejas con factor masculino alterado o sin resultados satisfactorios en los ciclos de fertilización *in vitro* [10]. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides consiste en inyectar un espermatozoide directamente en el citoplasma del oocito, sobrepasando la zona pelúcida y la membrana plasmática [11]. Este procedimiento está indicado en parejas con una marcada alteración en los parámetros seminales como: oligozoospermia ($<15 \times 10^6/\text{mL}$), astenozoospermia ($<32\%$ de espermatozoides móviles) y teratozoospermia ($<4\%$ de espermatozoides normales) [11,12]. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta revisión de la literatura es describir los fundamentos de la técnica inyección intracitoplasmática de espermatozoides y su relación con los parámetros seminales y la fertilidad.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides: ¿cuándo y por qué usarla?

De acuerdo a la información recientemente publicada por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE; del inglés, *European Society of Human Reproduction and Embryology*), en el año 2011 se realizaron 588.629 tratamientos de reproducción asistida en 33 países europeos, 151.923 en Estados Unidos y 66.347 en Australia y Nueva Zelanda. Se estima que en este mismo año se realizaron 1.500.000 ciclos de reproducción asistida en todo el mundo, con más de 350.000 bebés nacidos. Así mismo, la ESHRE reportó que la técnica más utilizada para la fecundación de los oocitos es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, lo que representa alrededor de dos tercios de los tratamientos de reproducción asistida en el mundo por encima de la fertilización *in vitro* convencional que representa el tercio restante. Estas proporciones varían entre los países aunque las tasas de embarazo de cada técnica son similares [13] (véase [tabla 1](#)).

De igual manera, el Comité Internacional de Monitoreo de Tecnologías de Reproducción Asistida (ICMART; del inglés, *International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies*), en 2012, informó que el número de niños nacidos como resultado de los tratamientos de reproducción asistida ha alcanzado un estimado de cinco millones desde el nacimiento de Louise Brown en julio de 1978 [14]. El cálculo se basó en el número de ciclos de fertilización *in vitro* e inyección intracitoplasmática de espermatozoides registrados en todo el mundo hasta el año 2008 con estimaciones adicionales para los siguientes tres años [15].

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides se ha convertido en una opción para los pacientes sin espermatozoides en el eyaculado (azoospermia), pues si la azoospermia es de

origen obstructiva es posible recuperar los espermatozoides por medios quirúrgicos, como la aspiración del epidídimo y la biopsia del tejido testicular. Incluso, en hombres con azoospermia no obstructiva es posible recuperar espermatozoides del eyaculado hasta en un 35% de los casos [16], después de una búsqueda minuciosa en el precipitado obtenido al centrifugar la muestra de semen (1.600 rpm/10 min) o después de una biopsia testicular. Generalmente, la calidad morfológica de los espermatozoides recuperados en estos pacientes es baja; sin embargo, el efecto de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es tan alto que se han logrado obtener tasas de fecundación y de embarazo aceptables a pesar de estos inconvenientes [17,18]. Además, se ha observado que el éxito de la fecundación durante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en individuos con oligoastenoteratozoospermia es 3,9 veces mayor que si se usara la fertilización *in vitro* [19].

Actualmente, el uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en pacientes con parámetros seminales en el límite inferior de referencia, o incluso normales respecto a los reportados en 2010 por la Organización Mundial de la Salud [12], es común en los laboratorios de reproducción asistida [20] e incluye otras indicaciones para evitar una baja fecundación de los oocitos como: infertilidad inexplicada, oocitos de mala calidad, bajo número de oocitos, edad materna avanzada, fallos en las fertilizaciones *in vitro* y fecundación de oocitos criopreservados o vitrificados [21]. La razón fundamental para todas estas indicaciones es evitar el fracaso de la fecundación [10]; sin embargo, no existe evidencia científica que justifique el uso rutinario de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides sin indicaciones bien establecidas [20,21].

Así mismo, la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides y en general los tratamientos de reproducción asistida han sido objeto de estudio para conocer su seguridad. Se conoce que la tasa de malformaciones congénitas de niños concebidos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en comparación con aquellos concebidos naturalmente no es estadísticamente significativa. Entretanto, los riesgos asociados a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides más relevantes son los embarazos múltiples y el bajo peso al nacer; sin embargo, el subsecuente desarrollo y crecimiento de estos niños es normal [22].

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides: procedimiento complejo

Uno de los factores determinantes del éxito de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es el uso de los instrumentos correctos, entre los que se encuentran un microscopio invertido con contraste de fase equipado con un sistema de contraste de modulación Hoffman y una platina calentadora para mantener los gametos a la temperatura corporal, mientras se encuentran fuera de la incubadora. Además, el microscopio debe tener acoplado el equipo de micromanipulación que consiste en soportes para las pipetas a cada lado, unidos por un tubo de teflón a los microinyectores, los cuales proporcionan fuerzas de succión y expulsión controladas. Las pipetas son de vidrio y tienen características específicas: una tiene extremos romos y se utiliza para sujetar el oocito mientras que la otra es afilada para permitir la inyección del espermatozoide. De otro lado, se encuentran los micromanipuladores para los movimientos bruscos de las pipetas y para los movimientos finos teniendo en cuenta que se pueden mover rápido o lento en varias direcciones: arriba, abajo, adelante, atrás, a la izquierda, a la derecha y

de manera circular a lo largo del eje horizontal [17]. Además, el éxito de este procedimiento depende de la experiencia y la habilidad del embriólogo que lo realiza, teniendo en cuenta que implica una curva de aprendizaje importante [23].

Procedimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Oocitos

Desde hace más de 25 años se realizan ciclos con estimulación ovárica controlada utilizando gonadotropinas para optimizar los tratamientos de reproducción asistida y aumentar la tasa de embarazo [24]. Una vez se logra el desarrollo de múltiples folículos (observados por ecografía) se realiza la aspiración transvaginal de los oocitos (bajo anestesia general) 36 horas después de la aplicación de la hormona gonadotropina coriónica humana (HCG). Posteriormente, los oocitos son incubados en medio de cultivo especializado para fertilización *in vitro* por aproximadamente tres horas antes de remover las células del cumulus. Luego, se evalúa la madurez de los oocitos en el microscopio (200 X) [25] y se seleccionan aquellos que han alcanzado la metafase de la segunda división meiótica, es decir, el estadio de desarrollo en el cual el oocito muestra el primer cuerpo polar en el espacio perivitelino. Finalmente, los oocitos son llevados a la incubadora alrededor de una hora hasta la inyección [17].

De otro lado, es necesario realizar la preparación de la muestra de semen para realizar una mejor selección de espermatozoides con buena morfología y, de esta manera, maximizar las probabilidades de fecundación, obteniendo tantos oocitos fecundados como sea posible así como embriones para transferir eventualmente [26].

Espermatozoides

El procesamiento para la recuperación de los espermatozoides de las muestras seminales se lleva a cabo utilizando diferentes métodos dependiendo de la calidad y la movilidad de los espermatozoides observados, y consiste en seleccionar los espermatozoides con mejor movilidad y separarlos del plasma seminal, los espermatozoides inmóviles, las células inmaduras y los detritus. Este proceso da lugar a una modificación en la movilidad flagelar y al movimiento de la cabeza del espermatozoide, lo que favorece la penetración de los oocitos. Así mismo, los espermatozoides deben ser capaces de llevar a cabo la reacción acrosómica, que consiste en la liberación de enzimas que permiten la penetración a través de la zona pelúcida [27]. Por tanto, técnicas tales como los gradientes de densidad y el *Swim-up*, están relacionadas con la adquisición de esta capacidad de fecundar [28].

Los gradientes de densidad se fundamentan en la selección de espermatozoides para vencer la dificultad que presentan los gradientes de 90% y 45%, y lograr llegar hasta el fondo del tubo después de la centrifugación; además, actúa como filtro para el plasma seminal, las células redondas, los detritus y los espermatozoides con movilidad no progresiva [27]. Para realizar este procedimiento se toma una alícuota de la muestra y se deposita suavemente sobre las capas de los gradientes discontinuos de 1,5 mL de 90% (*lower*) y 1,5 mL de 45% (*upper*), se centrifuga a 1.300 rpm durante 20 minutos y, posteriormente, el sedimento se resuspende en medio de cultivo y se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 1.300 rpm. Finalmente, se

realiza un lavado con 2 mL de medio, se centrifuga por 5 minutos a 1.600 rpm, y el sedimento se resuspende en un volumen de 0,3 a 0,5 mL [17] (véase [figura 1](#)). Esta técnica permite una mejor recuperación de los espermatozoides móviles en las muestras oligozoospermicas, astenozoospermicas y con abundantes células y detritus [27].

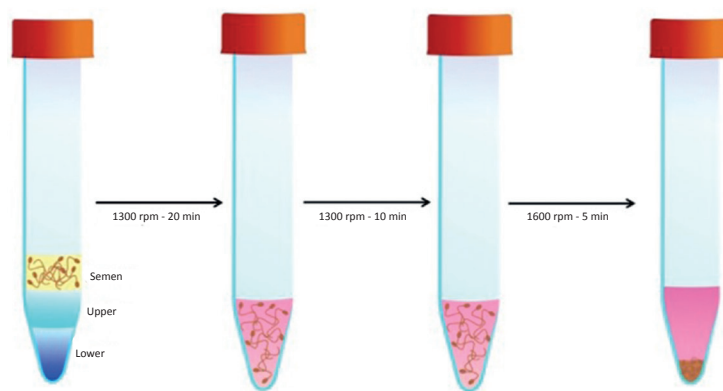


Figura 1. Procedimiento de recuperación espermática usando gradientes.

De otro lado, la técnica de *Swim-up* se basa en el principio de que sólo los espermatozoides con buena movilidad podrán ascender al sobrenadante; es una técnica sencilla que permite una recuperación favorable en muestras normozoospermicas [27]. Este procedimiento se lleva a cabo mediante la adición del medio de cultivo en una relación 1:1 con la muestra de semen, se centrifuga a 1.600 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se añade medio de cultivo al sedimento lentamente por la pared del tubo. Posteriormente, el tubo se incuba en un ángulo de 45° de inclinación durante 45 a 60 minutos a 37 °C. Al final de este período, el tubo se retira cuidadosamente de la incubadora y el fluido que está por encima del sedimento es recuperado, el cual, por lo general, contiene espermatozoides móviles que han nadado hacia arriba. Posteriormente, se vuelve a centrifugar para concentrar los espermatozoides y se resuspende el botón en 0,5 mL de medio (véase [figura 2](#)) [17,27].

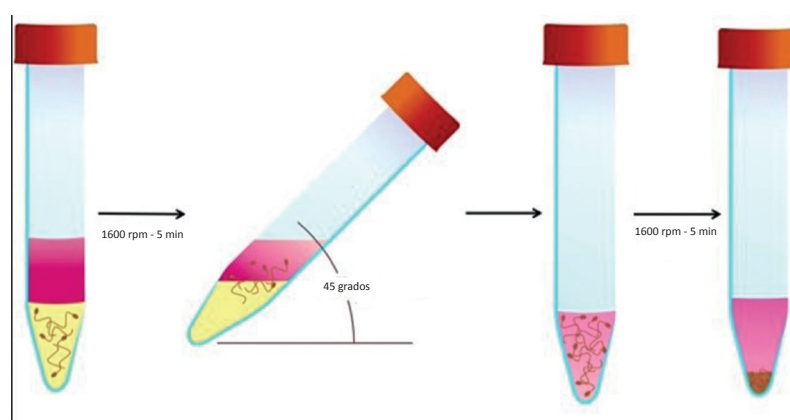


Figura 2. Procedimiento de recuperación espermática usando el método de *Swim-up*.

Interacción entre el espermatozoide móvil y el oocito

La cápsula en la cual se llevará a cabo la inyección de los oocitos se prepara con gotas de 5 μ L del medio de cultivo con Hepes y se cubren con 5 mL de aceite o parafina, y se preparan las microgotas necesarias para colocar los oocitos a inyectar.

Algunas de estas microgotas se vacían y se reemplazan por polivinilpirrolidona que facilita la manipulación de los espermatozoides. Una de las microgotas con polivinilpirrolidona se utiliza sólo para purgar la pipeta de inyección antes de comenzar la búsqueda de los espermatozoides, a otra se agregan 3 μ L de la suspensión espermática (espermatozoides ya capacitados) y en otra más se colocan los espermatozoides elegidos para la inyección [29]. Cuando se trata de muestras seminales de mala calidad (oligozoospermias severas o espermatozoides provenientes de biopsia testicular) no es posible realizar las técnicas anteriormente nombradas, por lo tanto, en estos casos se debe hacer un lavado simple de la muestra que consiste en centrifugar durante 5 minutos a 1.600 rpm, descartar el fluido sobrenadante y resuspender el sedimento en 0,3 mL a 0,5 mL y, posteriormente, incubar por una hora aproximadamente a 37 °C [30]. Pasado este tiempo, se trata la muestra tal como se explicó anteriormente.

Por otro lado, la selección de los espermatozoides se realiza en el microscopio en objetivo de 400X, observando su forma, refracción de la luz y patrón de movimiento en el medio viscoso, siendo aconsejable escoger los espermatozoides que «nadan» en el borde de la gota [11,31]. Además, se prepara una microgota con sólo medio de cultivo y espermatozoides ya procesados (servirá en los casos en que los espermatozoides incubados en polivinilpirrolidona pierden totalmente su movilidad o en casos de poca concentración) [29].

Una vez elegido el espermatozoide se debe inmovilizar para facilitar su manipulación, para que no destruya las estructuras del oocito una vez esté en el interior y para facilitar la descondensación del núcleo [29]. Para realizar la inmovilización se requiere colocar la punta de la pipeta sobre el tercio proximal a la zona media del espermatozoide y, con un movimiento en sentido perpendicular al eje del espermatozoide, se dobla el flagelo hasta que éste quede angulado, se aspira el espermatozoide por la cola y se procede a la inyección [31]. Posteriormente, se ubica el oocito de tal manera que el cuerpo polar quede en la posición horaria de las 12 o las 6 y se sostiene el espermatozoide, luego se presiona suave y gradualmente con la pipeta de inyección sobre la zona pelúcida y, una vez traspasada la zona pelúcida, se continúa presionando la membrana del oocito y se procura que se perfile perfectamente un cono alrededor de la pipeta, moviéndola de arriba abajo hasta que se consiga, y se intenta romper la membrana. Conseguida la ruptura de la membrana se completa la microinyección, se aspira el citoplasma para cerciorarse de que la membrana está rota, se pone en contacto con el espermatozoide y este se deposita suavemente, procurando no introducir la polivinilpirrolidona en el interior del oocito [29].

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides y parámetros seminales

Parámetros seminales convencionales

El espermograma es un análisis de la muestra de semen que se realiza de manera rutinaria en los laboratorios de andrología y es considerado como una prueba básica importante para investigar la infertilidad masculina [32], que se debe ejecutar de manera estandarizada con el fin

de evaluar los parámetros descriptivos de un eyaculado [12]. Aunque este análisis proporciona información útil en la evaluación inicial de los pacientes que consultan por infertilidad, no revela las características funcionales de los espermatozoides que determinan el proceso de maduración requerido para la fecundación [33], no está relacionado con la capacidad fértil del hombre [34-36]; además, no discrimina entre pacientes fértiles y subfértiles [37,38]. Por lo tanto, en la actualidad algunas investigaciones sugieren la necesidad de estudiar los parámetros funcionales para establecer la calidad de la muestra de semen, específicamente en los tratamientos de reproducción asistida [39].

De acuerdo al manual para la evaluación y procesamiento del semen humano de la Organización Mundial de la Salud publicado en 2010 [12], la evaluación del semen consiste en una valoración macroscópica inicial de la licuefacción, la viscosidad, la apariencia del eyaculado, el volumen y el pH. Posteriormente, se realiza la valoración microscópica que incluye los parámetros de movilidad, viabilidad, concentración y morfología espermática. Cada uno de los parámetros seminales tiene un valor límite de referencia (percentil 5), con el cual se determina si los parámetros de una muestra de semen son normales (véase [tabla 2](#)).

Tabla 2. Límite inferior de referencia para los parámetros seminales según la Organización Mundial de la Salud (2010)

Parámetro	Límite inferior de referencia
Volumen del semen (mL)	1,5
Concentración de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$)	15
Movilidad espermática (% de progresivos)	32
Viabilidad espermática (% de espermatozoides vivos)	58
Morfología espermática (% de espermatozoides normales)	4
pH	$\geq 7,2$

Teniendo en cuenta estos parámetros, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides se realiza cuando el factor masculino es severo; además, en pacientes con azoospermia obstructiva y todos los tipos de azoospermia no obstructiva que requieren biopsias testiculares [40]. En un estudio realizado por Bukulmez y colaboradores (2001) [41] se evidencia que no existen diferencias significativas en la tasa de implantación y el porcentaje de embarazo clínico cuando se inyecta con espermatozoides provenientes del eyaculado o de biopsias.

La morfología es uno de los parámetros más importantes al realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, ya que el embriólogo elige un espermatozoide para inyectar, evaluando su movilidad y su apariencia morfológica normal o adecuada. Algunos estudios indican que los resultados obtenidos por esta técnica no están relacionados con la morfología estricta, basándose en las tasas de fertilización [42] y en el desarrollo y la morfología de los blastocistos [43]. Sin embargo, De Vos y colaboradores (2003) [44] encontraron que cuando solo se dispone de espermatozoides morfológicamente anormales para inyectar, la tasa de implantación disminuye comparada con los espermatozoides normales.

En otra investigación, Keegan y colaboradores (2007) [45] evaluaron el efecto de la teratozoospermia aislada en oocitos fecundados por fertilización *in vitro* convencional y por inyección intracitoplasmática de espermatozoides, sin encontrar diferencias significativas en parejas con morfología anormal (< 5% de espermatozoides normales) y parejas con espermogramas normales; además, no observaron ninguna mejoría al tratar la teratozoospermia con inyección intracitoplasmática de espermatozoides. En lo que se refiere a los parámetros seminales macroscópicos como la licuefacción y la viscosidad no existe evidencia que sugiera que las muestras

anormales afecten la tasa de fecundación, específicamente después de realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides [46].

Respecto a los pacientes normozoospermicos, de acuerdo al estudio realizado por Bhattacharya y colaboradores (2001) [47], la inyección intracitoplasmática de espermatozoides no ofrece mejores resultados comparada con la fertilización *in vitro* convencional, debido a que con esta última lograron tasas de implantación y de embarazo más altas; por tal razón, los autores sugieren que en la práctica la inyección intracitoplasmática de espermatozoides se debe utilizar sólo en casos de alteración del factor masculino. Así mismo, Briton-Jones y colaboradores (2009) [48] no encontraron diferencias significativas entre la fertilización *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en cuanto a tasa de fecundación, tasa de desarrollo embrionario, calidad embrionaria y tasas de aneuploidias en pacientes normozoospermicos.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta el papel del factor femenino en los tratamientos de reproducción asistida como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides [41]. Es así como De Brucker y colaboradores (2014) [49] afirman que al utilizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides con muestras de donantes (normozoospermicos) el éxito de la técnica, traducido como tasa de nacimiento, depende de la edad de la mujer, teniendo una tasa mayor en las pacientes entre los 20 y los 29 años.

Integridad del ADN espermático

La evaluación de la integridad del ADN de los espermatozoides ha tomado gran importancia en los últimos años, debido a su carácter predictivo en la fecundación de oocitos [50] y en el desarrollo embrionario [51] en los tratamientos de reproducción asistida. La etiología del daño en el ADN de los espermatozoides, caracterizado por rupturas de cadena simple y doble, es multifactorial y puede estar relacionada con factores intrínsecos, que incluyen la deficiencia de protaminas, los niveles altos de especies reactivas de oxígeno y la apoptosis abortiva, y factores extrínsecos, entre los que se encuentran la exposición ambiental, la quimioterapia y, posiblemente, algunos factores del estilo de vida [52].

La integridad del ADN de los espermatozoides es considerado como un indicador significativo del potencial fértil debido a que se ha encontrado que los hombres con altos niveles de fragmentación tienen menos probabilidades de concebir naturalmente o a través de procedimientos tales como la inseminación intrauterina y la fertilización *in vitro* [53], y a que no se encuentra correlacionado con los parámetros seminales evaluados en el espermograma [39,54].

Varios estudios confirman la importancia de la integridad del ADN espermático para la transmisión adecuada de la información genética [55], cuya evidencia demuestra que los altos niveles de fragmentación en el ADN no sólo retrasan el desarrollo embrionario sino que también afectan las tasas de embarazo después de realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides [51,56]; además, se ha relacionado con la pérdida recurrente del embarazo y los abortos espontáneos [57-59].

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas altamente reactivas que actúan sobre los lípidos, los aminoácidos y los carbohidratos [55], y son producidas por los espermatozoides en

pequeñas cantidades, desempeñando un papel fisiológico que promueve la función espermática para la fertilización; sin embargo, el exceso de la producción de especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides anormales o los leucocitos seminales pueden conducir a un daño oxidativo [60]. La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno trae como consecuencia la disminución de la movilidad espermática y el daño en el ADN, lo cual se considera como una causa importante de la infertilidad. Así mismo, afecta negativamente la tasa de fecundación en los ciclos de fertilización *in vitro* y de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides [61]. Por otro lado, este parámetro funcional ha tomado gran importancia clínica debido a su carácter tanto diagnóstico como pronóstico, específicamente en los casos de infertilidad idiopática masculina [54,62].

Logros de la implementación de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides

La implementación de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en los laboratorios de reproducción asistida ha permitido que pacientes con muestras seminales anormales logren concebir un embarazo, existiendo actualmente varios estudios que lo corroboran. Incluso, en pacientes con azoospermia obstructiva y no obstructiva se han alcanzado tasas de embarazo favorables utilizando los espermatozoides provenientes de biopsias testiculares criopreservadas [18,63,64]. Así mismo, Goswani y colaboradores (2015) [65] reportaron dos casos en los que obtuvieron fecundación y desarrollo de embriones de buena calidad inyectando oocitos con espermátidas, lo cual puede significar una opción para aquellos pacientes con azoospermia no obstructiva que desean tener un hijo biológico.

Se conoce que diferentes condiciones que padecen algunos hombres pueden afectar negativamente la calidad de las muestras de semen; sin embargo, existen reportes de casos en donde, utilizando la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, se han obtenido resultados aceptables en la fecundación de oocitos y las tasas de embarazo, y nacimientos de niños en pacientes receptores de trasplantes renales [66], hombres con lesiones medulares [67], un paciente con un trastorno genético conocido como deficiencia en la 5 α -reductasa 2 [68] y un paciente con un defecto de nacimiento llamado Síndrome de Eagle-Barret [69].

Además, en pacientes subfértiles, es decir, aquellos con al menos un parámetro seminal anormal, se demostró que la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es una técnica más eficiente en términos de fecundación [70,71], mientras que en los casos con teratozoospermia severa (menor o igual que el 4% de espermatozoides normales de acuerdo a la morfología estricta de Kruger) [72,73] esta técnica ha presentado tasas de fecundación más altas comparado con la fertilización *in vitro* convencional; además, embriones de buena calidad [70]. De igual manera, estos mismos resultados fueron encontrados en un estudio realizado con pacientes que tenían parámetros seminales en el límite [74]. Sin embargo, las anomalías en la cabeza del espermatozoide y las vacuolas presentes pueden afectar los resultados en los ciclos de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides [75,76].

Conclusiones

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides es una técnica efectiva diseñada para tratar la infertilidad en pacientes con factor masculino severo, incluyendo pacientes sometidos a biopsias testiculares o punción del epidídimo, por lo tanto, todo el espectro de la infertilidad masculina se puede tratar. Así mismo, representa una opción para aquellas personas que desean un hijo biológico y están afectados por cualquiera de las condiciones patológicas ya mencionadas. Actualmente, representa el tratamiento de alta complejidad más utilizado en el mundo debido a su alta tasa de fecundación, su tasa de embarazo comparable a la fertilización *in vitro* convencional y la alta estandarización y eficacia demostrada. Uno de los factores determinantes en su éxito radica en el uso de instrumentos especializados como el microscopio invertido y el equipo de micromanipulación, que permiten el manejo de los gametos masculino y femenino, y en la experiencia y destreza del embriólogo encargado.

Bibliografía

1. **Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine.** Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013; 99: 63.
2. **Akhondali Z, Dianat M, Radan M.** Negative Chronotropic and Antidysrhythmic Effects of Hydroalcoholic Extract of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) on CaCl₂-Induced Arrhythmias in Rats. *Electron Physician* 2015; 7: 971-976.
3. **Puzziello L, Villasante A.** Inducción de la ovulación y coito programado. En: Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A, eds. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: aspectos clínicos* (ed 3ra). Madrid, España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2008: 13-21.
4. **Sánchez I, Amorós D, Lucco F, González S, Ballesteros A, Pellicer A.** Inseminación artificial. En: Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A, eds. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: aspectos clínicos* (ed 3ra). Madrid, España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2008: 23-40.
5. **Cantineau AE, Janssen MJ, Cohlen BJ.** Synchronised approach for intrauterine insemination in sub-fertile couples. *Cochrane Database Syst Rev* 2010: CD006942.
6. **Barros Delgadillo JC, Martínez Barrios E, Moreno Aburto C, Souraye M, Enríquez G, Manzur Navarrete F, et al.** Inseminación intrauterina versus coito programado en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76: 18-31.
7. **Macklon NS, Broekmans FJ, Fauser BCJM.** Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (ed 3ra). Reino Unido: Informa UK Ltd.; 2009: 447-458.
8. **Galan A, Campos P, Blanco C, Salinas R, Cobo A.** Inseminación de los ovocitos. En: Remohí J, Cobo A, Romero L, de los Santos M, Pellicer A, eds. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: laboratorio de reproducción asistida* (ed 3ra). Madrid, España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2008: 151-156.
9. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.
10. **Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology.** Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012; 98: 1395-1399.
11. **Palermo G, Neri Q, Takeuchi T, Hong S, Rosenwaks Z.** Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (ed 3ra). Reino Unido: Informa UK Ltd.; 2009: 171-180.
12. **World Health Organization.** WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (ed 5a). Suiza: WHO Press; 2010.
13. **Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, Castilla JA, et al.** Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 2016; 31: 233-248.
14. **Steptoe PC, Edwards RG.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
15. **European Society of Human Reproduction and Embryology.** ¶The world's number of IVF and

- ICSI babies has now reached a calculated total of 5 million. 2012. Disponible: <https://www.eshre.eu/Press-Room/Press-releases/Press-releases-ESHRE-2012/5-million-babies.aspx>. Consultado: octubre 2015.
16. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovski D, Bern O, Soffer Y, et al. Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1222-1226.
 17. Meniru GI. Intracytoplasmic sperm injection. En: Meniru GI, ed. *Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction*. Reino Unido: Cambridge University Press; 2004: 153-181.
 18. Ishikawa T, Shiotani M, Izumi Y, Hashimoto H, Koeguchi S, Goto S, et al. Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia. *Fertil Steril* 2009; 92: 174-179.
 19. Tournaye H. Management of male infertility by assisted reproductive technologies. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 423-435.
 20. Jones J, Horne G, Fitzgerald C. Who needs ICSI? A nationwide UK survey on ICSI use. *Hum Fertil (Camb)* 2012; 15: 144-149.
 21. Babayev SN, Park CW, Bukulmez O. Intracytoplasmic sperm injection indications: how rigorous? *Semin Reprod Med* 2014; 32: 283-290.
 22. Fauser BC, Devroey P, Diedrich K, Balaban B, Bonduelle M, Delemarre-van de Waal HA, et al. Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 162-182.
 23. Rubino P, Vigano P, Luddi A, Piomboni P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update* 2016; 22: 194-227.
 24. Rienzi LF, Ubaldi FM. Oocyte retrieval and selection. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (ed 3ra). Reino Unido: Informa UK Ltd.; 2009: 85-102.
 25. De Vos A. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 4: 59-64.
 26. Bourne H, Archer J, Edgar DH, Baker HWG. Sperm preparation techniques. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, eds. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives* (ed 3ra). Reino Unido: Informa UK Ltd.; 2009: 53-66.
 27. Sellés E, Pérez I, Pellicer J, López M. Capacitación espermática. En: Remohí J, Cobo A, Romero L, de los Santos M, Pellicer A, eds. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: laboratorio de reproducción asistida* (ed 3ra). Madrid, España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2008: 25-29.
 28. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 2139-2146.
 29. Zulategui J, Cobo A, Romero J, Galán A, Albert C, de los Santos M. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En: Remohí J, Cobo A, Romero L, de los Santos M, Pellicer A, eds. *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: laboratorio de reproducción asistida* (ed 3ra). Madrid, España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2008: 165-176.
 30. De Geyter C, De Geyter M, Behre HM. Assisted Reproduction. En: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, eds. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* (ed 3ra). Berlín, Alemania: Springer-Verlag; 2010: 470-497.
 31. Palermo GD, Bedford JM. Micromanipulation of Human Gametes, Zygotes, and Embryos. En: Keel BA, May JV, De Jonge CJ, eds. *Handbook of the Assisted Reproduction Laboratory*. CRC Press; 2000: 221-252.
 32. Barratt CL. Semen analysis is the cornerstone of investigation for male infertility. *Practitioner* 2007; 251: 8-10, 12, 15-17.
 33. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015; 8: 191-196.
 34. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolsstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998; 352: 1172-1177.
 35. De los Ríos J, Cardona WD, Berdugo JA, Correa C, Arenas A, Olivera-Angel M, et al. Los valores espermáticos de 113 individuos con fertilidad reciente no mostraron correlación con los parámetros establecidos por la OMS. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 147-152.
 36. Jequier AM. Clinical andrology--still a major problem in the treatment of infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 1245-1249.
 37. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, JD FH, Hompes PG, Kremer JA, et al. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertil Steril* 2011; 95: 1013-1019.
 38. Centola GM. Semen assessment. *Urol Clin North Am* 2014; 41: 163-167.
 39. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009; 91: 1801-1805.
 40. Goker EN, Sendag F, Levi R, Sendag H, Tavmergen E. Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 104: 129-136.

41. Bukulmez O, Yucel A, Yarali H, Bildirici I, Gurgan T. The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94: 250-255.
42. Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 564-568.
43. French DB, Sabanegh ES, Jr., Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril* 2010; 93: 1097-1103.
44. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003; 79: 42-48.
45. Keegan BR, Barton S, Sanchez X, Berkeley AS, Krey LC, Grifo J. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007; 88: 1583-1588.
46. Jiang Y, Cao Q-y, Li S-x, Meng F-y, Geng C-p, Song G. Impact of Semen Liquefaction and Viscosity on the Outcomes of in vitro Fertilization. *J Reprod & Cont* 2012; 23: 169-178.
47. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 2075-2079.
48. Briton-Jones CM, Buehler N, Danzer H, Surrey M, Hill DL. ICSI vs IVF in sibling oocytes on: fertilization rate, embryo cleavage rate, embryo quality and aneuploidy rates, from patients with primary unexplained infertility and normal semen analysis. *Fertil Steril* 2009; 92: S36.
49. De Brucker M, Camus M, Haentjens P, Francotte J, Verheyen G, Tournaye H. Cumulative delivery rates after ICSI with donor spermatozoa in different age groups. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 599-605.
50. Pregl Breznik B, Kovacic B, Vlasisavljevic V. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* 2013; 99: 1233-1241.
51. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. *Reprod Biol* 2015; 15: 94-100.
52. Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 157-166.
53. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 684-703.
54. Mayorga Torres JM, Peña B, Cadavid AP, Cardona Maya WD. La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2015; 80: 265-268.
55. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-345.
56. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717-1722.
57. Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011; 78: 792-796.
58. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2010; 94: 1465-1472.
59. Oleszczuk K, Giwerzman A, Bungum M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology* 2016; 4: 290-296.
60. Yeung C-H, Cooper TG. Sperm Quality and Function Tests. En: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, eds. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* (ed 3ra). Berlín, Alemania: Springer-Verlag; 2010: 140-151.
61. Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, et al. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 696-706.
62. Mayorga-Torres BJM, Cardona-Maya W, Cadavid Á, Camargo M. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Acta Urolog Española* 2013; 37: 221-227.
63. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 15-19.
64. Gil Salom M. Técnicas de recuperación espermática para inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en infertilidad masculina. *Arch Esp Urol* 2004; 57: 1035-1046.
65. Goswami G, Singh S, Devi MG. Successful fertilization and embryo development after spermatid injection: A hope for nonobstructive azoospermic patients. *J Hum Reprod Sci* 2015; 8: 175-177.
66. Berkkanoglu M, Bulut H, Coetzee K, Ozgur K. In-

- tracytoplasmic sperm injection in male renal transplant recipients. *Middle East Fertil Soc J* 2015; 20: 127-130.
67. Giulini S, Pesce F, Madgar I, Marsella T, Volpe A, de Aloysio D, et al. Influence of multiple transrectal electroejaculations on semen parameters and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2004; 82: 200-204.
 68. Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, Ogata T. Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5alpha-reductase-2 deficiency. *Fertil Steril* 2010; 94: 2770 e2777-2710.
 69. Fleming SD, Varughese E, Hua VK, Robertson A, Dalzell F, Boothroyd CV. Normal live births after intracytoplasmic sperm injection in a man with the rare condition of Eagle-Barrett syndrome (prune-belly syndrome). *Fertil Steril* 2013; 100: 1532-1535.
 70. Pisarska MD, Casson PR, Cisneros PL, Lamb DJ, Lipshultz LI, Buster JE, et al. Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertil Steril* 1999; 71: 627-632.
 71. Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P, et al. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril* 2002; 78: 1030-1037.
 72. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112-117.
 73. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 495-500.
 74. van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, Helmerhorst FM. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 395-400.
 75. Chaichian S, Tamannaie Z, Rohani H, Ahmadi M, Nasr MH, Pazouki A, et al. Relationship between sperm parameters and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Middle East Fertil Soc J* 2015; 20: 251-254.
 76. Falagario D, Bruculeri AM, Depalo R, Trerotoli P, Cittadini E, Ruvolo G. Sperm head vacuolization affects clinical outcome in ICSI cycle. A proposal of a cut-off value. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 1281-1287.

ARTÍCULO 2

Los parámetros espermáticos funcionales como factor pronóstico en ICSI: experiencia de la ciudad de Medellín.

Luisa F. Calderón-Mendoza^{1,2}, Lucero Castrillón López¹, Carlos Felipe Vélez Giraldo¹, Verónica Isaza Álvarez¹, Walter D. Cardona-Maya³.

¹ Centro de Medicina Reproductiva CONCEVIDAS. Medellín, Colombia.

² Estudiante de Maestría, Universidad CES, Medellín, Colombia.

³ Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Resumen

La infertilidad por factor masculino afecta al 30% de las parejas infértiles y la evaluación seminal es crítica en las determinaciones que conllevan a un posible tratamiento con el fin de tener un resultado exitoso. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación que existe entre los parámetros seminales convencionales y funcionales, con las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo obtenidas después de ICSI.

36 muestras seminales de parejas que se sometieron a ICSI (18 usando oocitos propios y 18 de donante) fueron evaluadas de manera convencional, posteriormente se seleccionaron los espermatozoides, se realizó el ICSI y una alícuota se utilizó para cuantificar las siguientes pruebas funcionales: potencial de membrana mitocondrial, integridad de la membrana, detección de especies reactivas de oxígeno e índice de fragmentación del ADN.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a los parámetros convencionales y funcionales en los dos grupos, como tampoco se encontró una relación significativa entre los parámetros evaluados y los resultados de ICSI. Sólo se observó que la tasa de embarazo fue mayor en el grupo de oocitos donados ($p < 0.0001$).

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que no existe correlación entre los parámetros evaluados y los resultados de ICSI. Esto se debe probablemente a que la selección de los espermatozoides por gradientes de densidad además de la posterior selección durante ICSI, tiene un bajo poder predictivo y así mismo, a la capacidad que tiene el oocito de reparar los daños presentes en el espermatozoide.

Abstract

Male infertility affects 30% of infertile couples and seminal evaluation is critical in the determinations that lead to a possible treatment in order to have a successful outcome. The objective of this study was to evaluate the relationship between conventional and functional seminal parameters, with the rates of fertilization, embryo development and pregnancy obtained after ICSI.

36 semen samples of couples that underwent ICSI (18 using own oocytes and 18 from donors) were conventionally evaluated, spermatozoa were subsequently selected, ICSI was performed and an aliquot was used to quantify the following functional tests: mitochondrial membrane potential, membrane integrity, reactive oxygen species detection and DNA fragmentation index.

There were no significant differences in the conventional and functional parameters in the two groups, nor was there a significant relationship between the parameters evaluated and the ICSI results. It was only observed that the pregnancy rate was higher in the group of donated oocytes ($p < 0.0001$).

The data obtained in this study suggest that there is no correlation between the parameters evaluated and the ICSI results. This is probably because the selection of spermatozoa by density gradients in addition to the subsequent selection during ICSI has a low predictive power and also the ability of the oocyte to repair the damage present in the spermatozoa.

Introducción

La infertilidad es una enfermedad que afecta a más de 70 millones de parejas en edad reproductiva en el mundo (1,2) y se calcula que aproximadamente el 30% de los casos se deben exclusivamente al factor masculino (3). Con el fin de determinar si el factor masculino está involucrado en la imposibilidad de conseguir un embarazo y estimar la gravedad del problema, se realiza generalmente un análisis de la muestra seminal o espermograma (4,5) el cual constituye una herramienta valiosa para el médico especialista (6) y hasta la fecha es el único examen que permite valorar el estado fértil de un individuo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde la década de los 80, ha realizado importantes esfuerzos con el fin de propiciar que las metodologías usadas durante el análisis seminal estén estandarizadas en los laboratorios en todo el mundo (7); sin embargo, el uso de estos parámetros no predice con exactitud y precisión la capacidad fértil de un hombre (5,8,9), ni los resultados de un tratamiento de reproducción asistida (10,11), lo cual es debido probablemente a que existen muchos factores que contribuyen a la capacidad que tiene un espermatozoide para interactuar con un oocito y generar un cigoto (5).

Es importante recalcar que durante la estimación de los parámetros seminales mediante el espermograma, no se valoran todos los aspectos de la función de los testículos (12), ni proporciona evidencia del origen etiológico y fisiológico de algún trastorno (13), y por esta razón surgieron las pruebas funcionales espermáticas,

las cuales son un conjunto de estudios especializados que evalúan aspectos funcionales de los espermatozoides y parecen estar más relacionadas con el potencial fértil del hombre (13,14). Así mismo, ofrecen más información acerca de la naturaleza, origen y causa de la infertilidad (15,16), además de estar asociadas con los resultados de la fertilización *in vitro* (FIV) (17).

De otro lado, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el procedimiento más ampliamente utilizado en el mundo para fecundar oocitos (18–20), ha posibilitado la fecundación independientemente de algunas características espermáticas como la morfología y la movilidad (21), además ha permitido obtener información relevante sobre el proceso de la fecundación, específicamente acerca de la activación del oocito y la liberación de calcio (22). La finalidad de esta técnica en principio fue tratar el factor masculino severo (23), pero en la actualidad tiene indicaciones de todo tipo incluyendo femeninas y por esta razón en muchos centros de medicina reproductiva sólo utilizan y dependen de la ICSI (24), de hecho, se utiliza del 70 al 80% de los casos (21).

A la fecha, las tasas de embarazo de los tratamientos de alta complejidad siguen siendo consideradas como subóptimas (25,26), lo cual puede ser el resultado del diagnóstico reducido y poco informativo de la calidad de los espermatozoides empleados en estos procedimientos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la relación que existe entre los parámetros seminales convencionales y funcionales, con las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo obtenidas por ICSI.

Materiales y métodos

Pacientes

Este estudio prospectivo se realizó entre febrero de 2016 y julio de 2017 en el Centro de Medicina Reproductiva Concevidas y el Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquia. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes y el estudio fue aprobado por el Comité de Bioética adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Se incluyeron 36 parejas, de las cuales 18 usaron sus propios oocitos y 18 recibieron oocitos donados. Sólo se incluyeron muestras de semen frescas y se excluyeron aquellas con oligozoospermia severa (<1 millón de espermatozoides/mL). La donación de oocitos es anónima y se buscaron voluntarias jóvenes (18 - 27 años) según las características fenotípicas de las receptoras. Adicionalmente, se realizaron exámenes serológicos para hemoclasificación, HIV, antígeno de Hepatitis B, anticuerpos contra Hepatitis C y citomegalovirus y cariotipo de acuerdo al artículo 13 de la resolución 3199 de 1998, exigida por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en Colombia.

Estimulación ovárica

La estimulación ovárica de pacientes y donantes comenzó a partir del día 1, 2 o 3 del ciclo menstrual con una ecografía transvaginal con el fin de verificar la quiescencia ovárica. Se inició la inducción de la ovulación con una dosis de FSH (GONAL-f®, Merck, Darmstadt, Alemania) ó con una dosis de FHS/LH (Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, Saint-Prex, Suiza ó Pergoveris® Merck Serono, Modugno, Italia) que varia desde 225UI hasta 450IU/día dependiendo de cada caso. Al sexto día de estimulación, se aplicó una dosis de antagonista de la GnRH (Cetrotide® Merck Frankfurt, Alemania) si habían folículos entre 14-15mm. Cuando se encontró una cohorte folicular de entre 19 y 20mm se realizó el disparo de la ovulación con un agonista de la GnRh (Gonapeptyl ® Daily, Ferring Pharmaceuticals, Kiel, Alemania) y 36 horas después se procedió a la aspiración folicular.

Posteriormente, las pacientes con oocitos propios comenzaron un soporte de progesterona por dos vías: oral con 400mg de progesterona natural cada noche (Utrogestan, Biopas Laboratories, Bogotá, Colombia) y vaginal con progesterona en gel al 8% todas las mañanas (Crinone®, Central Pharma, Reino Unido) hasta la determinación de la prueba de embarazo si era negativa o durante los tres primeros meses de embarazo si era positiva. De otro lado, las mujeres receptoras recibieron preparación endometrial previa a la transferencia de embriones con valerato de estradiol (Progynova® Bayer group, Alemania) por vía oral con una dosis de 6mg/día durante 10 a 15 días. Posteriormente, se realizó una ecografía transvaginal para determinar el grosor y la apariencia endometrial, además de una cuantificación sérica de estradiol. El día de la aspiración folicular de la donante se comenzó con soporte de progesterona de la misma forma que para las mujeres que usaron oocitos propios.

Recolección y preparación de la muestra de semen

Las muestras de semen fueron recolectadas por masturbación en un contenedor estéril después de aproximadamente 2 a 5 días de abstinencia sexual. Luego de la licuefacción, aproximadamente entre 45 minutos y 1 hora, se realizó la evaluación de los parámetros seminales convencionales siguiendo los lineamientos establecidos en el Manual para el procesamiento de semen humano de la OMS (2010) (7). Una vez realizado el espermograma, la muestra fue preparada por gradientes de densidad de 90 y 45% Sperm Grad (Vitrolife, Suecia) y el sedimento recuperado fue lavado y resuspendido con medio de cultivo All Grad Wash (Life Global, Estados Unidos de América) con el fin de realizar el procedimiento de ICSI, determinar la movilidad y morfología espermática post selección y cuantificar las pruebas funcionales espermáticas.

Pruebas funcionales

Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en el citómetro de flujo Epics XL (Becton Dickinson, CA, EUA), con una longitud de onda de excitación de 488 nm suministrada por un láser de argón. Las mediciones de dispersión frontal (forward scatter) y de dispersión lateral (side scatter) se utilizaron para seleccionar la población de espermatozoides a analizar y excluir los detritos y agregados que producen efectos indeseados en la fluorescencia general. Un total de 10.000

eventos fueron obtenidos por prueba y todos los datos fueron analizados posteriormente usando el programa FlowJo 7.6.2 (FlowJo LLC, OR, Estados Unidos de América).

Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ se evaluó usando la tinción con yoduro de 3,3'-di-hexiloxacarbocianina (DiOC6(3), Molecular Probes Inc., Países Bajos) un colorante lipófilo, catiónico y selectivo para las mitocondria de células vivas. El yoduro de propidio (IP, Molecular Probes Inc., Países Bajos) se utilizó como contratinción para discriminar células necróticas/muertas (27). Brevemente, 2×10^6 de espermatozoides se incubaron en 300 μ L de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4, Gibco®, NY, Estados Unidos de América) con DiOC6 (concentración final de 10 nM) y con IP (concentración final de 12 μ M) protegidos de la luz (30 min, a 25°C). A continuación, los espermatozoides se lavaron en PBS (180 g, 5 min), el botón fue resuspendido en PBS y se llevó al citómetro de flujo. Los datos fueron analizados como el porcentaje de espermatozoides vivos con alto y bajo $\Delta\Psi_m$.

Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN)

Los niveles intracelulares de ERO y ERN (específicamente H_2O_2 , HO^- , ROO^- y $ONOO^-$), fueron evaluados utilizando 2', 7'-di-acetato de di-cloro di-hidrofluoresceína (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos de América, concentración final de 1 μ M). Después de la escisión de los grupos acetato por las esterasas intracelulares, el DCFH oxida selectivamente por las ERO y ERN hasta 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual fluoresce en verde (27). El IP se utilizó para excluir las células necróticas/muertas. La suspensión de células se incubó protegida de la luz (30 min, a 25°C), se lavó tres veces con PBS (180 g, 5 min) y el botón fue resuspendido en PBS antes de ser analizado por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides positivos para DCF: espermatozoides vivos que exhiben la respuesta verde fluorescente (espermatozoides vivos produciendo ERO y ERN).

Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Se utilizó el estuche comercial LIVE/DEAD® Sperm (Molecular Probes Inc., Países Bajos), para evaluar la integridad de la membrana plasmática, el cual permite discriminar tres poblaciones de espermatozoides. Brevemente, 2×10^6 de espermatozoides se incubaron en 300 μ L de PBS con SYBR-14 y con IP (fluorescencia verde y roja, concentración final de 1 mM y 12 mM, respectivamente) protegidos de la luz (30 min, a 25°C), se lavaron con PBS (180 g, 5 min) y se resuspendieron en PBS antes del análisis por citometría de flujo. Los datos se expresaron como el porcentaje de espermatozoides viables (células de la membrana plasmática intacta, positivos a SYBR-14 y negativas para PI), células necróticas/muertas (positivas para IP) o espermatozoides moribundos (dobles positivos).

Integridad de la cromatina

La evaluación de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) se utilizó para determinar el índice de fragmentación del ADN espermático (IFA), según lo descrito previamente por Evenson et al (28) y adaptado en el Grupo Reproducción (27,29,30). Brevemente, 400µL de una solución de detergente ácido (HCl, NaCl, Triton X-100, agua, pH: 1,2) se añadieron a 5×10^6 de espermatozoides suspendidos en 200µL de buffer TNE (Tris-HCl, NaCl y EDTA, pH: 7,4). Después de 30 segundos, los espermatozoides se colorearon con 600µL de naranja de acridina (6 mg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). El IFA se calculó con la intensidad media de fluorescencia (IMF) roja en proporción a la fluorescencia total (IMF roja + IMF verde), multiplicado por 100.

Procedimientos de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Los oocitos recuperados se inyectaron 4 horas después de la recuperación de los líquidos foliculares y luego se colocaron en gotas de Global Total (Life Global, Estados Unidos de América) bajo parafina líquida equilibrada y se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 7,5% humidificada a 37°C. A las 16-18h después de la microinyección, los oocitos fueron evaluados en la etapa de pronúcleo. La fecundación fue calculada como el porcentaje de cigotos resultantes de los oocitos inyectados. La morfología del embrión se evaluó en los días 2 y 3 observando el número, la simetría y la granularidad de las blastómeras, así como también el tipo y el porcentaje de fragmentación. La transferencia de embriones se realizó el día 3 y los embriones restantes fueron vitrificados cuando su estado morfológico lo permitía. Un embrión adecuado para ser transferido tenía entre 7 y 9 células, menos del 20% de fragmentación y blastómeras simétricas.

La tasa de desarrollo embrionario se calculó como el número de embriones con el número de células correspondiente sobre el número total de embriones y 15 días después un aumento en la concentración sérica de gonadotropina coriónica βhCG indicaba embarazo.

Análisis estadístico

La distribución de los datos se evaluó mediante las siguientes pruebas de normalidad: D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones se realizaron usando la prueba de la prueba de Mann-Whitney. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos de América) y un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

Resultados

En este trabajo se observó una tasa de embarazo de 27.8% en pacientes con oocitos propios y de 83.3% en receptoras ($p < 0.0001$). Como era de esperar, las mujeres del grupo que uso oocitos donados eran mayores que las que usaron oocitos propios (39.77 ± 4.19 vs 35 ± 3.69 , $p = 0.0019$) y mayores que las donantes (39.77 ± 4.19 vs 23.61 ± 2.74 , $p < 0.0001$). Respecto a las edades de los hombres las edades fueron similares en el grupo de oocitos propios (38 ± 7.40) y el grupo de donantes (37.27 ± 8.22), $p > 0.05$.

Tanto en el grupo de los oocitos propios como en el de los donados se observó un incremento de la movilidad y una disminución de la concentración después de la selección espermática. Sin embargo, este último en la muestra inicial fue mayor en el grupo de oocitos donados con respecto a los propios ($p = 0.0470$), Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros seminales convencionales pacientes oocitos propios.

	Pre-selección	Post-selección	Valor de p
Volumen	3.9 ± 1.74		
Viabilidad	$63\% \pm 7.57\%$		
Movilidad	$35\% \pm 11.30\%$	$68\% \pm 24.85\%$	0.0001
Concentración	61.94 ± 41.66	40.88 ± 19.87	0.0058
Morfología	$3\% \pm 1.79\%$	$4\% \pm 2.08\%$	0.1072

Tabla 2. Parámetros seminales convencionales pacientes oocitos donados.

	Pre-selección	Post-selección	Valor de p
Volumen	2.5 ± 0.87		
Viabilidad	$66\% \pm 4.15\%$		
Movilidad	$40\% \pm 7.16\%$	$74\% \pm 14.09\%$	0.0001
Concentración	74.33 ± 23.41	45.27 ± 19.43	0.0283
Morfología	$3\% \pm 1.85\%$	$4\% \pm 1.95\%$	0.1423

Así mismo, no se observaron diferencias significativas en los parámetros funcionales evaluados en los dos grupos (Figura 1). Finalmente, en la Tabla 3 se encuentran los valores descriptivos de las tasas de fecundación y de desarrollo embrionario obtenidas en los dos grupos.

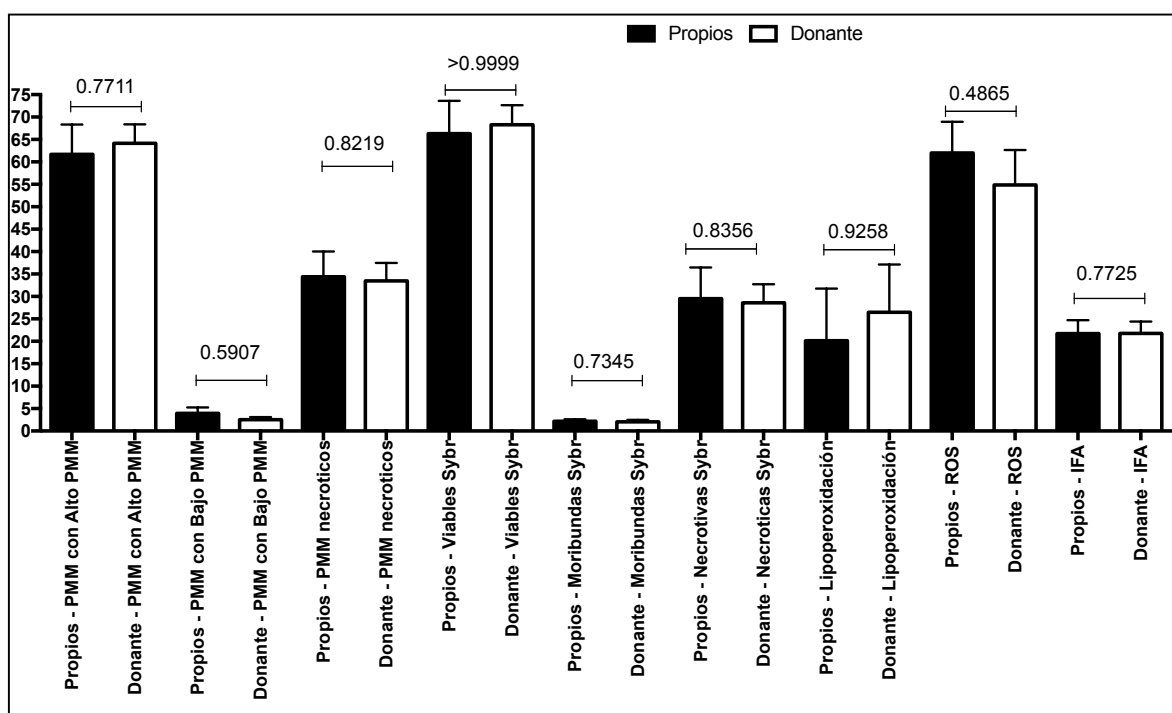
Discusión

Valorar y conocer más acerca el gameto masculino es muy importante, sobre todo cuando se utilizan técnicas de reproducción asistida con el fin de obtener mejores resultados, ya que en la actualidad son ampliamente usadas para lograr un embarazo. En este estudio se evaluó la relación entre los parámetros seminales

tanto convencionales como funcionales y las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo obtenidas después de ICSI, evidenciando que no existe ninguna relación.

Los parámetros convencionales no tienen relación con los resultados de ICSI, debido a que entre las limitaciones del análisis seminal (8,10,31) esta la imposibilidad de evaluar el proceso de capacitación de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino, la adquisición de las proteínas de la membrana plasmática que se requieren para la unión, la reacción acrosomal, la penetración de la zona pelúcida y la capacidad de fecundar el oocito (5). En algunos estudios se ha demostrado que el 15% de los hombres diagnosticados como normozoospermicos de acuerdo a la OMS (7) son infértiles, mientras que otros hombres con parámetros anormales son fértiles y logran embarazos de manera natural (9,32,33). Por lo tanto, una anomalía en un solo parámetro o en combinación no puede ser diagnóstico de infertilidad masculina (34).

Figura 1. Parámetros funcionales evaluados en las muestras seminales seleccionadas, en los grupos de oocitos propios y donados



PMM: Potencial de membrana mitocondrial – ROS: Especies reactivas de Oxígeno – IFA: Índice de fragmentación del ADN

Tabla 3. Valores descriptivos obtenidas en la tasa de fecundación y tasa de desarrollo embrionarios

	Oocitos microinyectados	Tasa de fecundación	Tasa de desarrollo embrionario
Propios	181	141 (78%)	98 (70%)
Donados	189	160 (85%) ^a	94 (59%) ^b
Total	370	301 (81.5%)	192 (64.5%)

^a: vs propios: p=0.27; ^b: vs propios: p=0.13.

Así mismo, algunas investigaciones concuerdan con el presente estudio, en las que afirman que los parámetros seminales no tienen ningún impacto en los resultados de ICSI (35,36). Sin embargo, otros estudios sugieren que en algunos casos la tasa de embarazo se ve afectada en muestras astenozoospermicas (37) y teratozoospermicas (38) después de usar ICSI. Los datos contradictorios anteriores evidencian la necesidad de un marcador mas robusto y específico para medir la subfertilidad masculina (8). Sin embargo, el espermograma es el estudio más básico disponible para el especialista y por lo tanto puede usarse como guía para determinar el siguiente paso en el diagnóstico y tratamiento (5).

Por otro lado, los defectos en la ultraestructura mitocondrial del espermatozoide parecen estar asociados con una baja movilidad (39) y la funcionalidad de este organelo es critica para la fecundación (40). Sin embargo, en este estudio, el potencial de membrana mitocondrial no se correlacionó con la movilidad pre o post selección ni influyó en las tasas de fecundación.

Así mismo, varias investigaciones que han evaluado el efecto de algunos parámetros como la concentración de ERO en los resultados de ICSI concuerdan con lo hallado en este estudio (41,42). Aunque por el contrario, otros autores han observado una asociación negativa entre los niveles de ROS y las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y embarazo (43–45) y estos niveles son más altos en el plasma seminal de hombres infértiles en comparación con hombres fértiles (46).

Las ERO son subproductos normales del metabolismo, y se requieren en pequeñas cantidades para procesos celulares específicos como la capacitación, la reacción acrosomal y la adquisición del estado hiperactivado (47). Sin embargo, cuando la concentración de ERO es demasiado alta o se supera la capacidad antioxidante se produce un estrés oxidativo, el cual puede afectar la membrana plasmática y la movilidad (42) y se considera como una de las principales causas del daño en el ADN espermático (48–50) y a su vez es el parámetro más estudiado, debido a que la integridad del ADN es critico para el mantenimiento del potencial reproductivo paterno y el desarrollo embrionario adecuado (51). Se ha demostrado que los espermatozoides con un genoma alterado son capaces de fecundar (52), planteando inquietudes acerca de la transmisión del material genético anormal a la descendencia, ya sea durante la concepción natural o

mediante el uso de un tratamiento de reproducción asistida (53). Adicionalmente se conoce que este daño está relacionado con movilidad y morfología anormales pero también se presenta en muestras de semen de hombres infértiles con parámetros seminales normales (54–56).

De acuerdo a lo anterior, Ioannou *et al.*, (2016) resaltaron en su trabajo la importancia de la integridad de la cromatina en el establecimiento y mantenimiento de un embarazo viable (57). Avendaño y Oehninger (2011) afirmaron que un alto índice de fragmentación puede estar asociado negativamente con la calidad del embrión y la probabilidad de embarazo (58). En este sentido, Simon *et al.*, (2014) demostraron que el daño en el ADN espermático disminuye significativamente el porcentaje de embriones de buena calidad de día 3 y de día 5 (51). Así mismo, parece ser un factor contribuyente en el riesgo de la pérdida de embarazo (59) y en los abortos recurrentes (29,60,61).

Varios estudios han demostrado su utilidad clínica en la evaluación de la fertilidad masculina en relación a la fecundación, el desarrollo embrionario a blastocisto y el embarazo (62–64). Sin embargo, otros autores afirman que los espermatozoides con alteraciones en su ADN pueden fecundar con éxito oocitos a través de FIV e ICSI (65,66) y que no existe una relación consistente entre el daño en el ADN y el desarrollo embrionario (67). De la misma manera, Esbert *et al.*, (2011) no encontraron relación entre la fragmentación del ADN y los resultados de ICSI con oocitos propios y donados (68). Nuñez-Calonge *et al.*, (2012) no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de parejas que logran o no un embarazo con respecto a la tasa de fecundación y desarrollo embrionario (69).

Todo lo anterior, soporta los resultados encontrados en este estudio y por lo tanto, el análisis de la integridad del ADN no fue suficiente para discriminar de forma confiable, como una prueba diagnóstica debe hacer, entre las parejas que pueden o no conseguir un embarazo (65). En este sentido, Simon *et al.*, (2011) concluyeron que el semen preparado por gradientes de densidad y el uso posterior en ICSI, tiene un bajo poder predictivo (70). Esto puede deberse a que la selección por gradientes de densidad reduce considerablemente la población de espermatozoides con daño (71) y la posterior selección al momento de hacer ICSI también contribuye, ya que se plantea la hipótesis de que los espermatozoides móviles y morfológicamente normales tienen un daño bajo en el ADN (72).

En el presente trabajo se encontró una diferencia significativa en la tasa de embarazo entre las pacientes con oocitos propios y donados ($p < 0.0001$), pero no se obtuvo ninguna relación entre la fragmentación del ADN espermático y los resultados de ICSI, lo cual ha sido encontrado por otros investigadores (68,73,74). Esta diferencia se debe probablemente a la capacidad de reparación del daño que posee el oocito humano (75,76). Cozzubbo *et al.*, (2014) encontraron que los oocitos de mujeres jóvenes tienen la capacidad de reparar el ADN espermático hasta en un 40%, mientras que los oocitos de mujeres mayores son más sensibles (77). La reparación de este daño depende de la edad de la mujer, el ambiente

ovárico y el tipo de infertilidad, las cuales son variables que no afectan usando oocitos donados (78,79).

Así mismo, Seli *et al.*, (2004) encontraron que el efecto mitigador del oocito sobre el daño se ve alterado con el aumento de la edad, ya que hallaron una relación entre el daño del ADN paterno y una baja formación de blastocistos en donde la edad de la mujer era de aproximadamente 35 años (80), lo que concuerda con este estudio, la media de la edad de las mujeres que usaron sus propios oocitos fue de 35 años. Meseguer *et al.*, (2008), afirman que usando oocitos propios, por cada aumento del 10% en la fragmentación del ADN espermático, la probabilidad de no embarazo aumentó en 1.31 (73).

Incluso, algunas investigaciones sugieren que la reparación del daño también ocurre en el cigoto (en modelos animales) (81,82) dependiendo enteramente de los ARNm y las proteínas maternas depositados y almacenados en el oocito antes de la ovulación (79). Por el contrario, sí el oocito no es capaz de reparar el daño, algunos estudios sugieren que este daño en el ADN espermático se expresa durante y después de la implantación conocido como efecto paterno tardío (83,84), presentándose abortos espontáneos (79).

Finalmente, el estudio de la infertilidad masculina presenta un problema clínico debido a que tanto el hombre como la mujer contribuyen independientemente a la fertilidad de la pareja (85). Sin embargo, las investigaciones sugieren que el factor femenino es muy importante para lograr un embarazo tanto natural como obtenido por tratamientos de reproducción asistida, hasta el punto de obviar el efecto de un factor masculino (8). En un estudio prospectivo, en el que incluyeron 3.917 parejas con infertilidad de origen desconocido, encontraron que la edad femenina fue la variable mas relevante y la calidad seminal no influyó ni fue estadísticamente significativa para obtener un embarazo (86).

En conclusión, en este estudio se encontró que no existe una correlación entre los parámetros tanto convencionales como funcionales con respecto a los resultados de ICSI, debido al efecto del uso de gradientes de densidad en la selección espermática y a la suficiencia de la ICSI como técnica de fecundación. También, se debe a la capacidad de los oocitos de mujeres jóvenes de reparar el daño del ADN presente en los espermatozoides, así como en el cigoto o en el embrión, y/o a la expresión de este daño en el desarrollo embrionario tardío que afecta la implantación. Sin embargo, la reproducción es un proceso complejo, potenciado por factores extrínsecos, como los protocolos de estimulación y los medios de cultivo, lo cual hace difícil identificar marcadores que aseguren un resultado exitoso. Adicionalmente, el factor femenino es determinante para permitir la fecundación, el desarrollo embrionario y el embarazo en los tratamientos de reproducción asistida e incluso de manera natural.

Referencias

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA.

- National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12).
2. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician.* 2015;91(5):308–14.
 3. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191–6.
 4. Cardona Maya W. Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud-2010. *Actas Urológicas Españolas.* Elsevier; 2010;34(7):577–8.
 5. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility.* 2014. p. 1502–7.
 6. Gosálvez J, Caballero P, López-Fernández C, Ortega L, Guijarro JA, Fernández JL, et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? *Asian J Androl.* 2013;15:812–8.
 7. WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. fifth edit. WHO Library; 2010.
 8. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic Clin Androl.* 2016;26(1):15.
 9. Cadavid ÁP, Los Ríos J De, Cardona WD, Berdugo JA, Correa C, Arenas A, et al. Los valores espermáticos de 113 individuos con fertilidad reciente no mostraron correlación con los parámetros establecidos por la oms. *Arch Esp Urol.* 2004;57(2):147–52.
 10. Lewis SEM. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction.* 2006;1741–7899.
 11. Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol. Italy;* 2009 Aug;61(4):261–83.
 12. Humm KC, Sakkas D. Role of increased male age in IVF and egg donation: Is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertil Steril.* 2013;99(1):30–6.
 13. Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1528–33.
 14. Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. *Int J Urol.* 2010;17(10):839–47.
 15. Cardona-Maya W. Functional Evaluation of Sperm in Colombian Fertile Men. *Arch Esp Urol.* 2007;60:827–31.
 16. Niżański W, Partyka A, Prochowska S. Evaluation of spermatozoal function—useful tools or just science. *Reprod Domest Anim.* 2016;51(iii):37–45.
 17. Vogiatzi P, Chrelas C, Cahill DJ, Creatsa M, Vrachnis N, Iliodromiti Z, et al. Hemizona assay and sperm penetration assay in the prediction of IVF outcome: A systematic review. *BioMed Research International.* 2013.
 18. Nyboe Andersen A, Carlsen E, Loft A. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries. *Hum Reprod Update.* 2008;14(6):593–604.
 19. Kupka MS, Hooghe TD, Ferraretti AP, Mouzon J De, Erb K, Castilla JA, et al.

- Assisted reproductive technology in Europe, 2011. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2016;21(7):1680–97.
20. Calderon-Mendoza LF, Cardona-Maya W. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, treinta años después de su implementación. *Med Lab.* 2015;27:431–2.
 21. Palermo GD, Neri Q V, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med.* United States; 2009 Mar;27(2):191–201.
 22. Neri Q V., Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium.* 2014;55(1):24–37.
 23. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem a C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340:17–8.
 24. Simopoulou M, Gkoles L, Bakas P, Giannelou P, Kalampokas T, Pantos K, et al. Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective. *Syst Biol Reprod Med.* Taylor & Francis; 2016;0(0):1–13.
 25. Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D’Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE dagger. *Hum Reprod.* 2014;29(10):2099–113.
 26. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, De Mouzon J, Erb K, Mocanu E, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1638–52.
 27. Mayorga-Torres BJM, Cardona-Maya W, Cadavid Á, Camargo M. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol españolas.* 2013;37(4):221–7.
 28. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002;23(1):25–43.
 29. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2010;94(4):1465–72.
 30. Rodríguez E, Gil-villa AM, Aguirre-acevedo DC. Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente : en busca de un valor de referencia. *Biomédica.* 2011;31:100–7.
 31. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2009;16(3):231–45.
 32. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.* 2006;85(3):629–34.
 33. Agarwal A, Allamaneni SSR. Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come. *Fertility and Sterility.* 2005. p. 850–3.
 34. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1388–93.

35. Kdous M, Merdassi G, Braham M, Zhioua A, Zhioua F. Impact of gamete cell quality on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Tunis Med.* Tunisia; 2015 Dec;93(12):750–5.
36. Pereira N, Neri Q V., Lekovich JP, Spandorfer SD, Palermo GD, Rosenwaks Z. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles for complete teratozoospermia: A case-control study Using Paired Sibling Oocytes. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
37. Mitchell V, Rives N, Albert M, Peers MC, Selva J, Clavier B, et al. Outcome of ICSI with ejaculated spermatozoa in a series of men with distinct ultrastructural flagellar abnormalities. *Hum Reprod.* 2006;21(8):2065–74.
38. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003;79(1):42–8.
39. Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, et al. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2011;95(2):641–6.
40. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction.* 2013;146(5).
41. Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W, Fischer Hammadeh C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277(6):515–26.
42. Pujol A, Obradors A, Esteo E, Costilla B, García D, Vernaev V, et al. Oxidative stress level in fresh ejaculate is not related to semen parameters or to pregnancy rates in cycles with donor oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(4):529–34.
43. Yeung CH, De Geyter C, De Geyter M, Nieschlag E. Production of reactive oxygen species by and hydrogen peroxide scavenging activity of spermatozoa in an IVF program. *J Assist Reprod Genet.* Netherlands; 1996 Jul;13(6):495–500.
44. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl.* 2003;26(5):279–85.
45. Agarwal A, Allamaneni SSR, Nallella KP, George AT, Mascha E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: A qualified meta-analysis. *Fertil Steril.* 2005;84(1):228–31.
46. Padron OF, Lynne CM, Brackett NL, Thomas AJ, Sharma RK, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 1997;67(6):1115–20.
47. de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* 2008. p. 106–15.
48. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - A clinical perspective. *Human Reproduction Update.* 2008. p. 243–58.
49. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC.

- Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4):878–85.
50. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl. China*; 2004 Mar;6(1):59–65.
 51. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod*. 2014;29(11):2402–12.
 52. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA Damage Resulting From Various Sperm Treatments Persists After Fertilization and Is Similar Before and After DNA Replication. *J Androl*. 2012;33(2):229–38.
 53. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendano C, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril*. 2009;92(3):835–48.
 54. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertil Steril*. 2002;78(2):313–8.
 55. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne P a, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000;21(1):33–44.
 56. Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N, Giwercman A, Bungum M. Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology*. 2013;1(3):357–60.
 57. Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(2):157–66.
 58. Avendano C, Oehninger S. DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J Androl*. 2011;32(4):356–63.
 59. Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonnette F, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2495–500.
 60. Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril*. 2009;92(2):565–71.
 61. Leach M, Aitken RJ, Sacks G. Sperm DNA fragmentation abnormalities in men from couples with a history of recurrent miscarriage. *Aust N Z J Obstet Gynaecol. Australia*; 2015 Aug;55(4):379–83.
 62. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*. 2000;73(1):43–50.
 63. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*. 2004. p. 1289–95.
 64. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57:78–85.
 65. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict

- pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2008;89(4):823–31.
66. Zini A, Sigman M. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? *Pros and Cons. J Androl*. 2009;30(3):219–29.
67. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm dna damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011. p. 391–7.
68. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011. p. 704–10.
69. Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C, Guijarro JA, Fernández JL, Johnston S, et al. An Improved Experimental Model for Understanding the Impact of Sperm DNA Fragmentation on Human Pregnancy Following ICSI. *Reprod Sci*. 2012;19(11):1163–8.
70. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(6):724–34.
71. Rougier N, Uriondo H, Papier S, Checa MA, Sueldo C, Alvarez Sedó C. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time. *Fertil Steril*. 2013;100(1):69–74.
72. Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1023–9.
73. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1191–9.
74. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril*. 2011;95(1):124–8.
75. Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*. 2010;18(4):357–65.
76. Bazrgar M, Gourabi H, Yazdi PE, Vazirinasab H, Fakhri M, Hassani F, et al. DNA repair signalling pathway genes are overexpressed in poor-quality pre-implantation human embryos with complex aneuploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;175(1):152–6.
77. Cozzubbo T, Neri QV, Rosenwaks Z, Palermo GD. To what extent can oocytes repair sperm DNA fragmentation? *Fertil Steril*. 2014;102(3):e61.
78. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(45):17725–9.
79. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. p. 14026–52.
80. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;82(2):378–83.
81. Derijck A, Van der heijden G, Giele M, Philippens M, De boer P. DNA

- double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet*. 2008;17(13):1922–37.
82. Olsen A, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(2 Suppl):521–31.
 83. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004;19(3):611–5.
 84. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 2006;21(11):2876–81.
 85. Gannon JR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *Bienn Rev Infertil*. 2015;4(1):1–5.
 86. Van Geloven N, Van Der Veen F, Bossuyt PMM, Hompes PG, Zwinderman AH, Mol BW. Can we distinguish between infertility and subfertility when predicting natural conception in couples with an unfulfilled child wish? *Hum Reprod*. 2013;28(3):658–65.

ARTÍCULO 3

Date: 19/07/2017
To: "Walter D Cardona Maya" wdario.cardona@udea.edu.co
From: "Urología Colombiana" eesserver@eesmail.elsevier.com
Reply To: "Urología Colombiana" urologiacolombiana@elsevier.com
Subject: UROCO-D-17-00025R1: decisión de los editores / editorial decision

Apreciado Dr. Cardona Maya:

Le comunicamos que su manuscrito "Calidad seminal e inseminación intrauterina: Estudio retrospectivo //// Semen quality and intrauterine insemination: a retrospective study." (Ref. UROCO-D-17-00025R1) ha sido aceptado para su publicación en Urología Colombiana.

Recuerde que en su momento le remitiremos las pruebas de autor en formato pdf a esta misma dirección electrónica.

Reciba un cordial saludo,

Comité Editorial
Urología Colombiana

Calidad seminal e inseminación intrauterina: Estudio retrospectivo

Semen quality and intrauterine insemination: a retrospective study.

Luisa F. Calderón-Mendoza^{1,2}, Lucero Castrillón López¹, Carlos Felipe Vélez Giraldo¹, Walter D. Cardona-Maya³, Verónica Isaza Álvarez¹.

¹ Centro de Medicina Reproductiva CONCEVIDAS. Medellín, Colombia.

² Estudiante de Maestría, Universidad CES, Medellín, Colombia.

³ Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Dirección para correspondencia

Grupo Reproducción, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia. Tel: 2196476. Dirección: Carrera 53 # 61 – 30. Sede de Investigación Universitaria, SIU; Laboratorio 534. E-mail: wdario.cardona@udea.edu.co

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros seminales en muestras seminales frescas y seleccionadas y determinar los factores que predicen el éxito de la inseminación intrauterina (IIU).

Materiales y métodos: Todas las parejas que se sometieron a IIU se registraron retrospectivamente y se incluyeron un total de 419 ciclos. Las muestras de semen fueron seleccionadas usando el método *swim-up*.

Resultados: No se encontró un parámetro seminal que pueda ser considerado como predictor de embarazo. Después de la preparación de la muestra, hubo una mejoría en la movilidad espermática y una disminución en la concentración. Adicionalmente, una diferencia significativa en el volumen entre los individuos menores de 40 años y mayores a 40 años fue observada.

Conclusión: No existen parámetros seminales que puedan predecir el éxito de la inseminación, básicamente debido a que lograr un embarazo depende de muchos factores. Sin embargo, el procesamiento en el laboratorio mejora considerablemente la movilidad espermática de las muestras y la IIU tiene tasas de embarazo aceptables; por lo tanto, debe ser considerada como primera elección de tratamiento.

Palabras claves: Espermatozoide, inseminación intrauterina, embarazo, fertilidad, factor masculino.

Abstract

Objective: The aim of the study was to evaluate the sperm parameters in fresh and washed samples and define the factors for predicting success after intrauterine insemination (IUI).

Materials and methods: All couples undergoing IUI were retrospectively enrolled, a total of 419 IUI cycles were included. Sperm samples were prepared using the *swim-up*.

Results: There were no seminal parameters that could be considered as being predictors of pregnancy. After sperm washed, there was an improvement in sperm motility and a decrease in sperm concentration. There was also a significant difference in volume between individuals under 40 and those over 40.

Conclusion: There are no seminal parameters that can predict the success of the insemination, basically because achieving a pregnancy is due to many factors. However, laboratory processing considerably improves the sperm motility of samples and IUI has acceptable pregnancy rates; therefore it should be considered a first choice treatment.

Keywords: Sperm, Intrauterine insemination, Pregnancy, Fertility, Male factor.

Introducción

La inseminación intrauterina (IIU) es un tratamiento de reproducción asistida que se puede utilizar para contrarrestar la infertilidad en ciertos grupos de pacientes (1), consiste en depositar los espermatozoides previamente seleccionados en la cavidad uterina a mujeres que han recibido una estimulación ovárica (2). Tiene una variedad de indicaciones entre las que se incluye el factor masculino leve, hostilidad cervical e infertilidad de origen desconocido (3). La IIU se considera como una técnica de reproducción asistida simple y de bajo costo (4) e incluso gracias a su eficacia actualmente se reconoce como un tratamiento de reproducción asistida de primera línea para la mayoría de parejas infértiles (1), debido a que alcanza tasas acumulativas de embarazo similares a las obtenidas en un solo ciclo de técnicas de reproducción asistida más complejas (2). Obtener entre el 10 y el 20% de embarazos clínicos por ciclo es un rango aceptable para la IIU (5).

Muchos factores reportados han sido utilizados como predictores de éxito después de la IIU: la edad (6), la estimulación ovárica (7), la reserva ovárica de las mujeres (8) y los parámetros espermáticos (4). Varios parámetros seminales y espermáticos se han correlacionado con el embarazo clínico después de la IIU incluyendo el número de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (3). Sin embargo, no existe un consenso sobre que parámetros seminales puedan predecir el logro de un embarazo después de realizar una IIU y aún existe controversia con respecto a la predicción del embarazo teniendo en cuenta los parámetros espermáticos.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio retrospectivo fue evaluar los parámetros espermáticos en muestras frescas y seleccionadas y definir los factores que puedan predecir el éxito de la IIU.

Materiales y métodos

Todas las parejas sometidas a IIU que asistieron al Centro de Medicina Reproductiva ConceVidas (<http://www.concevidas.com>) fueron registradas retrospectivamente. Se incluyeron un total de 419 ciclos de IIU entre 2012 y 2016. En el estudio, sólo se incluyeron los casos de pacientes con muestras de semen frescas y se excluyeron los casos en los cuales se usó semen congelado o muestras de semen de donante. Se consideraron como parejas elegibles, todas en las cuales la mujer tenía al menos una trompa de Falopio permeable y una cavidad endometrial normal. Así mismo, se incluyeron parejas con infertilidad por factor masculino, siempre y cuando se observaran espermatozoides móviles en el eyaculado.

Las muestras de semen que tuvieron una concentración espermática ($\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides/mL), movilidad progresiva ($\geq 32\%$) y morfología espermática ($\geq 4\%$) se consideraron como normales, de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010 (9).

Todas las muestras de semen fueron recibidas en el laboratorio después de 3 a 6 días de abstinencia sexual. Se evaluaron parámetros macroscópicos (volumen, pH, apariencia, viscosidad) y microscópicos (concentración espermática, viabilidad y movilidad) después de la licuefacción. Además, se prepararon extendidos del eyaculado para analizar la morfología siguiendo los criterios de la OMS (9). Así mismo, se calculó la movilidad total y el recuento total de espermatozoides móviles en muestras frescas y seleccionadas.

La inducción de la ovulación se realizó de acuerdo a la situación particular de cada mujer. En general, se utilizaron dos esquemas: a) Citrato de clomifeno (Zimaquin, Gynopharm, Bogotá, Colombia) y hormona folículo - estimulante urinaria (FSH) (Gonagam-hMG, Zone Pharma, Baesweiler, Alemania) o Menopur® (Ferring Pharmaceuticals; Saint-Prex, Suiza); o b) FSH recombinante (GONAL-f®, Merck, Darmstadt, Alemania) comenzando en el primer, segundo o tercer día del ciclo con

una dosis entre 75 y 150 unidades internacionales (UI). El crecimiento folicular fue monitoreado mediante ecografía transvaginal y los ajustes de dosis se realizaron hasta que los folículos presentaban un diámetro entre 18 y 20 mm. Para desencadenar la ovulación se utilizaron 5000 IU de gonadotropina coriónica humana urinaria (Gonagam-hCG, ZONE Pharma, Baesweiler, Alemania), 6500 UI de hCG recombinante (Ovidrel®, Merck, Darmstadt, Alemania) o 0,5 mg de acetato de leuprolida (Lupron®, Abbott, Chicago, EE.UU.).

Las muestras de semen se seleccionaron usando el método de *swim-up*. En todos los casos, la muestra se lavó con All Grad Wash (LifeGlobal, Connecticut, EE.UU.) dos veces por centrifugación y el sedimento se resuspendió en 0.7 mL con All Grad Wash, finalmente se evaluaron la concentración, la movilidad progresiva y la morfología espermática.

En todos los casos, se realizó la inseminación de 12 a 14 horas después de la inyección de hCG. Todas las pacientes recibieron 400 mg/día de progesterona micronizada (Utrogestan, Biopas Laboratories, Bogotá, Colombia) después del procedimiento hasta el día de la prueba de embarazo. Las muestras de suero se obtuvieron 14 a 15 días después de la administración de hCG para evaluar sus niveles de β hCG.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) y un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM)

Resultados

En el presente estudio, se obtuvieron 71 embarazos de 419 ciclos de IIU, teniendo en total una tasa de embarazo de 16.9%.

La media de la edad masculina y femenina en el momento de la inseminación fue de 37.1 ± 0.7 años (media \pm SEM) y 33.41 ± 0.5 años, respectivamente. No hubo diferencias en la edad de los hombres y las mujeres, entre las pacientes que obtuvieron un embarazo y aquellas que no.

En la Tabla 1, se comparan los parámetros seminales en los grupos de parejas que no lograron el embarazo frente a las que lo lograron. De todas las características espermáticas estudiadas, ninguna mostró diferencias significativas entre los grupos antes y después del procesamiento de la muestra de semen. Sin embargo, las muestras en el grupo de embarazo evidenciaron mejores parámetros seminales, aunque no fueron estadísticamente significativo.

Por otro lado, la movilidad mejoró después del proceso de selección ($p < 0.0001$), la concentración espermática disminuyó ($p < 0.0001$) y la morfología no varió ($p < 0.05$). Estos cambios no tuvieron efecto en las tasas de embarazo clínicas debido a que resultados similares fueron observados en ambos grupos (Figura 1).

Finalmente, al analizar los parámetros seminales en relación con la edad masculina, este estudio encontró diferencias significativas en las muestras frescas (no separadas) entre los hombres menores (284 pacientes) y los mayores de 40 años (127 pacientes): volumen (3.6 ± 0.1 mL vs. 3.2 ± 0.1 mL, $p < 0.01$) y en el número total de espermatozoides móviles ($114.2 \pm 5.5 \times 10^6$ vs. $87.2 \pm 6.1 \times 10^6$, $p < 0.01$). Sin embargo, después del procesamiento del semen, no se encontraron diferencias en los parámetros seminales entre los dos grupos.

Es importante aclarar que cuando se eliminaron los parámetros seminales y los resultados de embarazo de los pacientes que repitieron el proceso de IIU, los resultados de los análisis estadísticos fueron los mismos.

Discusión

La IIU es una técnica de reproducción asistida de baja complejidad con tasas de éxito aceptables para el tratamiento de diferentes alteraciones en las parejas infértiles (10,11). Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluaron varios parámetros seminales como predictores de un resultado exitoso después de realizar una IIU, este estudio intenta evidenciar los efectos de las características espermáticas antes y después de seleccionar los espermatozoides de las muestras de semen con el embarazo después de realizar una IIU.

En el presente estudio no se encontró un parámetro relevante que pueda predecir un embarazo después de la IIU, tanto en muestras frescas como seleccionadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Luco *et al.*, (2014) quienes concluyeron después de realizar 357 inseminaciones que no existe un parámetro seminal predictor del éxito de la IIU (12). Un estudio, recientemente publicado por Atasever *et al.*, (2016) también soporta estos resultados en pacientes diagnosticados con infertilidad de origen desconocido e infertilidad masculina leve (13).

Adicionalmente, Zhao *et al.*, (2004) observaron que la movilidad inicial fue significativamente más alta en pacientes que lograron un embarazo y que la movilidad post selección no fue diferente entre el grupo de pacientes embarazadas y el grupo de pacientes no embarazadas, lo cual es consistente con el presente estudio. Adicionalmente, no encontraron un efecto significativo en el resultado de la IIU relacionado con la concentración espermática inicial, la movilidad y el número total de espermatozoides móviles (4). Algunos estudios sugieren que el conteo total de espermatozoides móviles en fresco debe ser al menos de 5 millones (14,15), mientras que otros insisten en que debe ser de al menos 10 millones (16,17). De hecho, una revisión sistemática de literatura realizada por Ombelet *et al.*, (2014) confirma que el número total de espermatozoides móviles en las muestras en fresco presenta una mejor correlación con el éxito de la IIU cuando el rango es entre 5 y 10 millones de espermatozoides/mL (15); así, de acuerdo a estos resultados, el número total de espermatozoides móviles es el mejor predictor de embarazo comparado con los parámetros seminales convencionales (18).

Tjon-Kon-Fat *et al.*, (2016) llegaron a la conclusión que el número total inicial de espermatozoides móviles es el mejor predictor del éxito reproductivo. No obstante, si el número total de espermatozoides móviles es menor a 10 millones de espermatozoides/mL, estos investigadores recomiendan realizar una fertilización in vitro (FIV) (19).

Wang *et al.*, (2014) confirman que si el número total de espermatozoides móviles después de la selección espermática es mayor o igual a 5 millones, se puede considerar como el parámetro principal para lograr un embarazo después de realizar la inseminación, conclusión conseguida después de analizar 379 ciclos de IIU (20). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores quienes aseguran que este parámetro es el más relacionado con el embarazo (21,22). Sin embargo, mencionan que el éxito del número total de espermatozoides móviles depende de los pacientes de cada clínica y de la metodología para la preparación del semen (21), en contraste, otro estudio afirma que el número mínimo de espermatozoides inseminados debe ser de 1 millón (22).

De acuerdo con la morfología espermática estricta, aunque es un componente esencial del análisis del semen, parece no afectar el hecho de obtener un embarazo. En el presente estudio, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (embarazo vs no embarazo) en relación con la morfología de los espermatozoides. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores y sugieren que este parámetro por sí solo no es confiable, debido a la subjetividad inherente y la creciente proporción de hombres diagnosticados erróneamente con morfología anormal, causando una pérdida de su valor predictivo (23–26). Así, Shabtaie *et al.*, (2016) recomienda realizar la inseminación a pesar de la morfología anormal considerada por el manual actual de la OMS (< 4% de formas normales) (9), siempre y cuando las muestras seminales presenten movilidad y concentración espermáticas normales (23). En contraste, en un estudio prospectivo realizado por Butcher *et al.*, (2011) se encontró en 1243 ciclos de IIU que altos niveles de morfología normal ($\geq 18\%$ de formas normales) son un indicador clínico positivo y podría incrementar la probabilidad de embarazo (27).

Después del procesamiento del semen, se espera que la técnica de selección mejore la calidad de los parámetros seminales. En el presente estudio, la movilidad mejoró, La concentración espermática disminuyó y no hubo variación en el porcentaje de formas normales. Ruitter-Ligeti *et al.*, (2015) encontraron que el procesamiento de la muestra de semen mejora en la mayoría de los parámetros espermáticos con excepción del número total de espermatozoides móviles, el cual es considerado como el parámetro clínicamente más importante (28).

De otro lado, la influencia de la edad masculina sobre la fertilidad es un área de investigación cada vez más relevante y actualmente se sabe muy poco sobre este factor en comparación con los bien investigados efectos de la edad femenina. De hecho, en el presente estudio se observó una diferencia significativa en el volumen y en el número total de espermatozoides móviles entre hombres menores y mayores de 40 años en las muestras frescas. Sin embargo, en los parámetros seminales después de la selección espermática no hubo diferencias.

Estos datos son respaldados por estudios que muestran una disminución significativa en el volumen, y por lo tanto en el número total de espermatozoides y en el número total de espermatozoides móviles (29–31).

Aparentemente, a medida que la edad aumenta, se presentan cambios anatómicos y hormonales que podrían resultar en el deterioro de los parámetros seminales (32). Se conoce muy bien que la mayor parte del volumen del semen se origina en las vesículas seminales y se ha reportado que este volumen disminuye con el avance de la edad (33). Esto también está relacionado con una reducción en la producción del fluido andrógeno-estimulante en la próstata y en las vesículas seminales, debido a que los niveles de testosterona disminuyen con la edad (34). Así mismo, se producen cambios en la próstata, como la atrofia del músculo liso y una disminución en el contenido de proteínas y agua, que pueden afectar el volumen de semen (35). Sin embargo, ninguno de estos estudios pudo demostrar una correlación significativa entre la edad paterna y otras características espermáticas.

Kidd *et al.*, (2001) realizaron un estudio para establecer la asociación entre la edad masculina, la calidad del semen y el estado de la fertilidad. Sus resultados

muestran que postergar la paternidad disminuye la calidad del semen en el volumen, la movilidad y morfología de los espermatozoides y, por tanto, la fertilidad (36), debido a que aumenta el tiempo para conseguir un embarazo (37). Otros estudios afirman que la edad paterna se refleja sobre todo en la fertilización, el desarrollo embrionario y la implantación (38–40).

En el caso de las mujeres, ha sido muy bien estudiado y establecido que a partir de los 35 años de edad la reserva ovárica disminuye considerablemente y por lo tanto la probabilidad de embarazo. Sin embargo, para los hombres no hay punto de corte debido a la falta de estudios. De la Rochebrochard y Thonneau (2003) llevaron a cabo un estudio en el que proponían que a partir de los 40 años de edad, el riesgo de presentar un factor masculino alterado aumenta en comparación con hombres más jóvenes (41). En nuestro estudio, encontramos una diferencia significativa en el volumen de semen cuando se utiliza 40 años como un punto de corte.

En conclusión, el presente estudio no encontró ningún parámetro seminal relevante como predictor de éxito de la IIU. Esto puede deberse a que el logro de un embarazo es multifactorial y es necesario tener en cuenta variables como la edad de la mujer, el protocolo de estimulación y la duración de la infertilidad, entre otros. El procesamiento del semen en el laboratorio mejora la movilidad de los espermatozoides y la IIU tiene tasas de embarazo aceptables, por lo que debe considerarse como un tratamiento de primera elección. Por último, aunque la edad masculina tiene un efecto sobre el volumen de semen, no afecta negativamente las tasas de embarazo.

Referencias

1. Meniru G. Intrauterine insemination. Cambridge Guide to Infertility Management and Assited Reproduction. 1rs ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
2. Vargas-Hernández VM, Tovar-Rodríguez JM, Acosta-Altamirano G, Moreno-Eutimio MA. Papel de la inseminación intrauterina en la era de la fertilización in vitro. Clin Invest Ginecol Obstet. 2014;41(1):29–34.
3. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. Fertil Steril.

- 2009;91(3):777–81.
4. Zhao Y, Vlahos N, Wyncott D, Petrella C, Garcia J, Zacur H, et al. Impact of semen characteristics on the success of intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21(5):143–8.
5. Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update.* 2003;8(4):373–84.
6. Devranoğlu B, Özdamar Ö, Köle E, Eken MK, Bozdağ H, Doğer E. Do younger women with elevated basal follicular stimulating hormone levels undergoing gonadotropin-stimulated intrauterine insemination cycles represent compromised reproductive outcomes? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;199:141–5.
7. Hansen KR, He ALW, Styer AK, Wild RA, Butts S, Engmann L, et al. Predictors of pregnancy and live-birth in couples with unexplained infertility after ovarian stimulation -intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 2016;105(6):1575–1583.e2.
8. Moro F, Tropea A, Scarinci E, Leoncini E, Boccia S, Federico A, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations and antral follicle counts for the prediction of pregnancy outcomes after intrauterine insemination. *Int J Gynecol Obstet.* 2016;133(1):64–8.
9. WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. fifth edit. WHO Library; 2010.
10. Erdem M, Abay S, Erdem A, Firat Mutlu M, Nas E, Mutlu I, et al. Recombinant FSH increases live birth rates as compared to clomiphene citrate in intrauterine insemination cycles in couples with subfertility: A prospective randomized study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;189:33–7.
11. Yumusak OH, Kahyaoglu S, Pekcan MK, Isci E, Cinar M, Tasci Y. Does intrauterine insemination timing matter for achieving pregnancy during ovulation induction using gonadotropins? A retrospective cohort study. *J Chinese Med Assoc.* 2016;4–8.
12. Luco SM, Agbo C, Behr B, Dahan MH. The evaluation of pre and post processing semen analysis parameters at the time of intrauterine insemination in couples diagnosed with male factor infertility and pregnancy rates based on stimulation agent. A retrospective cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;179:159–62.
13. Atasever M, Namli Kalem M, Hatirnaz S, Hatirnaz E, Kalem Z, Kalaylioglu Z. Factors affecting clinical pregnancy rates after IUI for the treatment of unexplained infertility and mild male subfertility. *J Turkish Ger Gynecol Assoc.* 2016;17(3):134–8.
14. Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): An analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril.* 2010;93(1):79–88.
15. Ombelet W, Dhont N, Thijssen A, Bosmans E, Kruger T. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: A systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(3):300–9.

16. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, et al. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*. 2002;60(3):497–501.
17. Dorjpurev U, Kuwahara A, Yano Y, Taniguchi T, Yamamoto Y, Suto A, et al. Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *J Med Invest*. 2011;58(1–2):127–33.
18. Papillon-Smith J, Baker SE, Agbo C, Dahan MH. Pregnancy rates with intrauterine insemination: comparing 1999 and 2010 World Health Organization semen analysis norms. *Reprod Biomed Online*. 2014;30(4):392–400.
19. Tjon-Kon-Fat RI, Tajik P, Custers IM, Bossuyt PMM, Van Der Veen F, Van Wely M, et al. Can we identify subfertile couples that benefit from immediate in vitro fertilisation over intrauterine insemination? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;202:36–40.
20. Wang L, Sun N, Lu X, Zhang Q, Xu C, Cao Y, et al. Effect of Timing and Number of Intrauterine Insemination (IUI) on the Cycle Clinical Outcome. *J Reprod Contracept*. 2014;25(4):219–26.
21. Van Weert JM, Repping S, Van Voorhis BJ, Van Der Veen F, Bossuyt PMM, Mol BWJ. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: A meta-analysis. *Fertil Steril*. 2004;82(3):612–20.
22. Dinelli L, Courbière B, Achard V, Jouve E, Deveze C, Gnisci A, et al. Prognosis factors of pregnancy after intrauterine insemination with the husband's sperm: Conclusions of an analysis of 2,019 cycles. *Fertil Steril*. 2014;101(4):994–1000.
23. Shabtaie SA, Gerkowicz SA, Kohn TP, Ramasamy R. Role of Abnormal Sperm Morphology in Predicting Pregnancy Outcomes. *Curr Urol Rep*. 2016;17(9):67.
24. Lemmens L, Kos S, Beijer C, Brinkman JW, van der Horst FAL, van den Hoven L, et al. Predictive value of sperm morphology and progressively motile sperm count for pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2016;105(6):1462–8.
25. Erdem M, Erdem A, Mutlu MF, Ozisik S, Yildiz S, Guler I, et al. The impact of sperm morphology on the outcome of intrauterine insemination cycles with gonadotropins in unexplained and male subfertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016;197:120–4.
26. Deveneau NE, Sinno O, Krause M, Eastwood D, Sandlow JI, Robb P, et al. Impact of sperm morphology on the likelihood of pregnancy after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1584–90.
27. Butcher M, Gantt P, Broce M, Seybold D, Randall G. 2183 the Use of Sperm Parameters To Predict Clinical Pregnancy With Intrauterine Insemination. *J Urol*. 2011;185(4):e875.
28. J. Ruiter-Ligeti CA, Dahan M. The impact of semen processing on sperm quality and pregnancy rates with intrauterine inseminations. *Fertil Steril*. 2015;104(3):e246.
29. Bellver J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online*.

- 2008;17(5):595–604.
30. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2008;90(1):97–103.
 31. Luna M, Finkler E, Barritt J, Bar-Chama N, Sandler B, Copperman AB, et al. Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1772–5.
 32. Dain L, Auslander R, Dirnfeld M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril*. 2011;95(1):1–8.
 33. Hayakawa T, Naya Yoshio KM. Significant changes in volume of seminal vesicles as determined by transrectal sonography in relation to age and benign prostatic hyperplasia. *Tohoku J Exp Med*. 1998;186:193–204.
 34. Goldman N, Montgomery M. Fecundability and husband's age. *Soc Biol*. 1989;36(3–4):146–66.
 35. Harman S. Clinical aspects of aging of the male reproductive system. In: Schneider EL, editor. *The aging reproductive system*. New York: Raven Press; 1978.
 36. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: A review of the literature. *Fertil Steril*. 2001;75(2):237–48.
 37. Hassan MAM, Killick SR. Effect of male age on fertility: Evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril*. 2003;79(SUPPL. 3):1520–7.
 38. Klonoff-Cohen HS, Natarajan L. The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(2):507–14.
 39. Duran EH, Dowling-Lacey D, Bocca S, Stadtmauer L, Oehninger S. Impact of male age on the outcome of assisted reproductive technology cycles using donor oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(6):848–56.
 40. Raberi A, Rozis G, Alfarawati S, Glynn K, Lansdowne L, Batha S, et al. A comprehensive study into the effects of advancing male age on semen parameters, sperm genetic integrity and the outcome of assisted reproductive treatments. *Fertil Steril*. 2016;106(3):e304.
 41. De La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age 40 years: An important risk factor for infertility. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(4):901–5.

Figura 1. Parámetros espermáticos pre y post selección en los grupos divididos según el éxito gestacional.

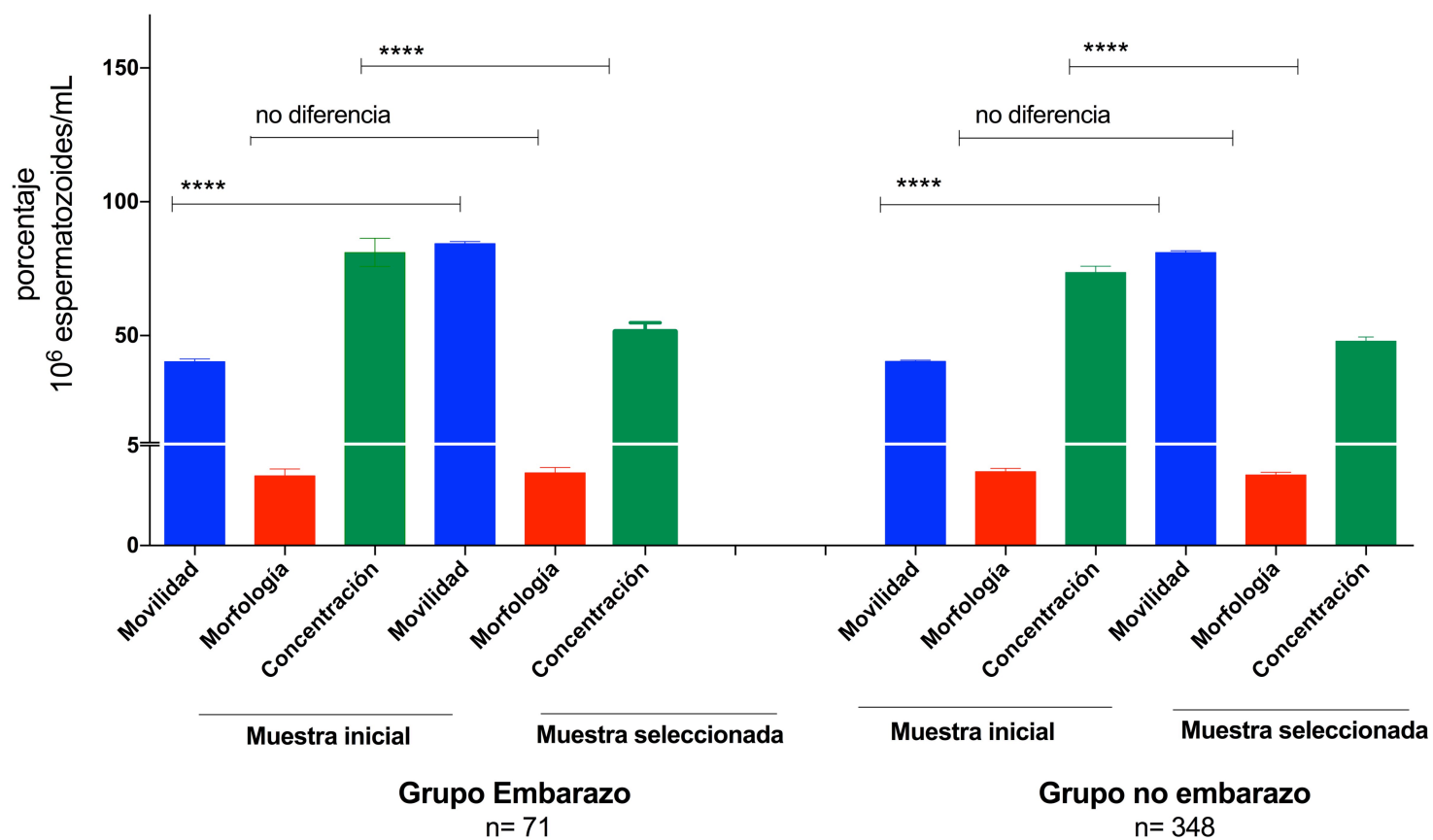


Tabla 1. Comparación de los parámetros seminales en los grupos de embarazo y no embarazo en muestras frescas y lavadas

Parámetros seminales	No embarazo (Media \pm SEM)	Embarazo (Media \pm SEM)	Valor p
Muestra inicial			
Concentración (10^6 /mL)	73.7 \pm 2.3	81.1 \pm 5.3	> 0.05
Volumen (mL)	3.5 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2	> 0.05
Movilidad (%)	40.34 \pm 9.49	40.21 \pm 7.71	> 0.05
Morfología (%)	3.7 \pm 0.2	3.5 \pm 0.3	> 0.05
Número total de espermatozoides móviles (TMSC, 10^6)	104 \pm 4.6	120.2 \pm 11.7	> 0.05
Móviles totales (TM)	30.8 \pm 1.1	33.2 \pm 2.4	> 0.05
Muestra procesada			
Concentración (10^6 /mL)	47.9 \pm 1.6	51.5 \pm 3.3	> 0.05
Movilidad (%)	81.1 \pm 0.6	84.4 \pm 0.7	> 0.05
Morfología (%)	3.5 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	> 0.05
Movilidad total (TM, 10^6)	39.82 \pm 1.4	43.7 \pm 2.9	> 0.05

CONCLUSIONES GENERALES

La infertilidad así como los tratamientos de reproducción asistida son temas que en la actualidad han generado mucha atención por parte de los investigadores debido al aumento y prevalencia de esta enfermedad que se ve reflejado en el incremento de las consultas a los especialistas a nivel mundial, por lo tanto, es necesario realizar estudios en estas áreas debido a que a pesar de los interesantes trabajos realizados en estos 30 años las tasas de embarazo aún son subóptimas.

A pesar de no encontrar en este estudio una relación entre los parámetros seminales convencional y funcionales y los resultados obtenidos por ICSI, el factor masculino es muy importante sobre todo cuando se utilizan oocitos propios, y así mismo, es de gran relevancia en la etapa de implantación y posterior desarrollo.

Los tratamientos de baja complejidad deben considerarse como la primera opción para la pareja infértil, en los casos que se pueda aplicar, ya que la tasa de embarazo es aceptable y ofrece buenos resultados sobre todo cuando se utiliza estimulación ovárica.

La reproducción es un proceso complejo y adicionalmente existen factores que influyen en el éxito de un tratamiento como la estimulación ovárica y las condiciones de cultivo, lo que hace difícil encontrar un único indicador para conseguir un embarazo.

Lograr un embarazo depende de múltiples factores; sin embargo, el factor femenino y en especial la edad de la mujer, son determinantes para conseguirlo. En este caso, utilizamos oocitos propios y donados y aunque no se relacionaron con los parámetros seminales evaluados, sí se evidenció una diferencia notable entre estos dos grupos.

Es necesario incluir más pacientes en este estudio, y así mismo, continuar investigando el papel del gameto masculino en la infertilidad y en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

Perspectivas

En una futura investigación la idea es incluir un número mayor de pacientes y muestras de semen de donantes. Además de intentar estudiar en detalle los oocitos y los medios de cultivo utilizados, con el fin de evaluar diferentes metodologías.

Otro punto importante, sería poder realizar en un próximo estudio biopsias endometriales a las pacientes que usan sus propios oocitos y simultáneamente evaluar los parámetros funcionales de las muestras de semen y de esta manera conocer su relación en la implantación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R. J., Wingate, J. K., De Iuliis, G. N., & McLaughlin, E. A. (2007). Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Molecular Human Reproduction*, 13(4), 203–211. <http://doi.org/10.1093/molehr/gal119>
- Babayev, S. N., Park, C. W., & Bukulmez, O. (2014). Intracytoplasmic sperm injection indications: how rigorous? *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(4), 283–90. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1375180>
- Eisenberg, M. L., Lathi, R. B., Baker, V. L., Westphal, L. M., Milki, A. A., & Nangia, A. K. (2013). Frequency of the Male Infertility Evaluation: Data from the National Survey of Family Growth. *The Journal of Urology*, 189(3), 1030–1034. <http://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.239>
- Elder, K & Dale, B. (2011). Micromanipulation techniques. In B. Elder, K; Dale (Ed.), *In vitro fertilization* (3rd ed., pp. 216–237). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), 25–43. <http://doi.org/10.100>
- Fauser, B. C., Devroey, P., Diedrich, K., Balaban, B., Bonduelle, M., Delemarre-van de Waal, H. A., ... Evian Annual Reproduction Workshop, G. (2014). Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online*, 28(2), 162–182. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.013>
- Franken, D. R., & Oehninger, S. (2012). Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*, 14(November 2011), 6–13.
- Gil-Villa, A. M., Cardona-Maya, W., Agarwal, A., Sharma, R., & Cadavid, A. (2010). Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1465–72. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.042>
- Hughes, E. G., Grantmyre, J., & Zini, A. (2015). An integrated approach to male-factor subfertility: bridging the gap between fertility specialists trained in urology and gynaecology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal D'obstetrique et Gynecologie Du Canada: JOGC*, 37(3), 258–265.
- Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility - The other side of

- the equation. *Australian Family Physician*, 46(9), 641–646.
- Kliesch, S. (2014). Diagnosis of male infertility: Diagnostic work-up of the infertile man. *European Urology, Supplements*, 13(4), 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.eursup.2014.08.002>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191–196. <http://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>
- Kupka, M. S., Hooghe, T. D., Ferraretti, A. P., Mouzon, J. De, Erb, K., Castilla, J. A., ... Goossens, V. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2011. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*, 21(7), 1680–1697. <http://doi.org/10.1093/humrep/del075>
- Lindsay, T. J., & Vitrikas, K. R. (2015). Evaluation and treatment of infertility. *American Family Physician*, 91(5), 308–314.
- Lopez, M. J., Urbano, A., & Cardenas, M. (2012). *Manual De Laboratorio Para El Analisis Del Semen*.
- Mayorga-Torres, B. J. M., Cardona-Maya, W., Cadavid, Á., & Camargo, M. (2013). Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urológicas Españolas*, 37(4), 221–7. <http://doi.org/10.1016/j.acuro.2012.06.008>
- Meniru, G. (2004). Intracytoplasmic sperm injection. In *Cambridge Guide to Infertility Management and Assited Reproduction* (pp. 153–181). United Kingdom: Cambridge University Press.
- Neri, Q. V., Lee, B., Rosenwaks, Z., Machaca, K., & Palermo, G. D. (2014). Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*, 55(1), 24–37. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.10.006>
- Oehninger, S., Franken, D. R., & Ombelet, W. (2014). Sperm functional tests. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1528–33.
- Palermo, Gianpiero. Neri, Queenie. Takeuchi, Takumi. Hong, Simon. Rosenwaks, Z. (2009). Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In Z. Gardner, David. Weissman, Ariel. Howles, Colin. Shoham (Ed.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies Laboratory and Clinical Perspectives* (Third Edit, pp. 171–180). United Kingdom: Informa UK Ltd.
- Palermo, G. D., Neri, Q. V., & Rosenwaks, Z. (2015). To ICSI or not to ICSI. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(2), 92–102. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1546825>

- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, a C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17–18. [http://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-F](http://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-F)
- Rodríguez, E., Gil-villa, A. M., & Aguirre-acevedo, D. C. (2011). Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente : en busca de un valor de referencia. *Biomédica*, 31, 100–107.
- Rubino, P., Vigano, P., Luddi, A., & Piomboni, P. (2015). The ICSI procedure from past to future : a systematic review of the more controversial aspects. *Hum. Reprod. Update*, 0(0), 1–34. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmv050>
- Samplaski, M. K., Agarwal, A., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2010). New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. *International Journal of Urology*, 17(10), 839–847.
- Sellés, E. Pérez, I. Pellicer, J. López, M. (2008). Capacitación espermática. In A. Remohí, J. Cobo, A. Romero, J. De los Santos, M. Pellicer (Ed.), *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida* (3ra ed., pp. 25–29). Madrid: McGraw Hill.
- The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine. (2012). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1395–1399. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.026>
- WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen* (fifth edit). WHO Library.
- Winters, B., Gannon, J. R., & Walsh, T. J. (2015). The epidemiology of male infertility. *Biennial Review of Infertility*, 4(1), 1–5. http://doi.org/10.1007/978-3-319-17849-3_1
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., ... van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
- Zegers-Hochschild, F., Schwarze, J. E., Crosby, J. A., Musri, C., & Do Carmo Borges De Souza, M. (2015). Assisted reproductive technologies in Latin

America: The Latin American Registry, 2012. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(1), 43–51. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.10.003>

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Identificación de los investigadores:

Investigador Principal Walter Darío Cardona Maya, Bact, Msc, PhD. Dirección: Calle 62 # 52-59. Teléfono: 2196477 Correo electrónico: wdario.cardona@udea.edu.co. Sitio de trabajo: Departamento de Microbiología y Parasitología, Grupo Reproducción, Sede de Investigación Universitaria, UdeA.

Luisa Fernanda Calderon, Biologa, estudiante de Maestria, Universidad CES. Centro de Medicina Reproductiva ConceVidas. Dirección: Carrera 43ª #1 a sur-29. Teléfono: 3122020 Correo electrónico: luisa.fernanda.cm@hotmail.com

Sitio donde se llevará a cabo el estudio:

Instalaciones de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia y del centro reproductivo ConceVidas.

Entidades que respaldan la investigación: Universidad de Antioquia.

Entidades que patrocina la investigación: Centro de Medicina Reproductiva ConceVidas y Grupo Reproducción, Universidad de Antioquia.

Información para los pacientes

Los investigadores del presente proyecto lo invitan a participar en una investigación que busca evaluar el efecto de los parámetros que se evalúan en la muestra de semen con el resultado del procedimiento al que usted se someterá (inyección intracitoplasmática de espermatozoides -ICSI-), Para este estudio se espera que participen al menos 30 voluntarios aparentemente sanos que consultan al Centro de Medicina Reproductiva ConceVidas y que por motivos de tratamiento médico se realizarán el procedimiento de ICSI.

Es importante recalcar que el procedimiento de ICSI de todas formas será realizado por CONVECIDAS, por lo tanto aunque la información obtenida para el procedimiento será analizada en el presente estudio, las indicaciones, los riesgos y todo el protocolo para el procedimiento de rutina, esta investigación no pagará ni mejorará ninguno de los procedimientos del ICSI.

Procedimientos del estudio

Si usted acepta participar, de la misma muestra que será llevada a ConceVidas para el ICSI, obtenida por masturbación con una abstinencia sexual mínima de 3 y 5 días será usada para la cuantificación de las pruebas convencionales y funcionales seminales. Se recolectarán al menos 30 participantes, los cuales se esperan recoger en 2.5 años.

La muestra será recibida en un recipiente estéril de boca ancha, transportada al sitio del análisis en un periodo máximo de 1 hora, deberá entregarse debidamente marcada con el nombre completo del voluntario, cédula, fecha y hora de recolección.

Finalmente, el seguimiento del resultado del ICSI se realizará por medio del análisis de la información obtenida por el médico tratante y si es el caso se contactará personalmente por vía telefónica.

Beneficios

Si usted acepta participar recibirá una copia del resultado del espermograma, descripción de la cantidad y la calidad de los espermatozoides, sin embargo no recibirá ninguna compensación monetaria. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a entender algunos fenómenos relacionados con infertilidad y el potencial fértil de los hombres.

Riesgos

En la literatura no se reporta ningún riesgo durante la masturbación. El riesgo físico potencial en esta investigación es mínimo, dado que la recolección de la muestra será llevada a cabo por el individuo.

Responsabilidades del paciente: *Donar la muestra de semen y contestar la información solicitada de manera veraz y verificable.*

Responsabilidades del investigador

Este se compromete a guardar la confidencialidad de sus datos. De igual forma se responsabiliza con aclarar la situación de la investigación y del investigador frente a las entidades de salud y las instancias legales pertinentes. Si el voluntario requiere alguna información de los análisis o los datos obtenidos estos serán suministrados por el investigador principal.

Alternativas del procedimiento

No existe un método alternativo más seguro que permita obtener la muestra de semen.

Confidencialidad

Sólo los investigadores sabrán que usted está participando en el estudio. Los datos que se generen de este proyecto serán publicados en artículos nacionales e internacionales y se garantiza la confidencialidad de su identidad. Los datos se mantendrán bajo asignación de un código conocido solo por el investigador principal y serán manejados en una base de datos de acceso restringido al grupo de investigadores.

Personas a contactar

Si tiene cualquier pregunta acerca de este estudio, puede comunicarse con Walter Dario Cardona Maya en el Grupo Reproducción, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia al teléfono 2196477.

Si tiene dudas con respecto a sus derechos y deberes adquiridos con el estudio, deberá contactar al comité de bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, teléfono 2196055.

Terminación del estudio

Usted entiende que su participación en el estudio es VOLUNTARIA. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio.

Información generada en este estudio:

La información generada en este estudio que sea relevante en el tratamiento del ICSI se suministrará tanto al participante, de ser el caso particular, como al médico tratante a solicitud expresa de los interesados.

Posterior uso de las muestras recolectadas:

Las muestras de semen, espermatozoides y plasma seminal, no serán almacenadas para estudios posteriores. Las muestras de semen serán descartadas siguiendo todas las recomendaciones y directrices establecidas por la Sede de Investigación Universitaria para el descarte de material biológico.

El paciente

Después de haber recibido la pasada información acepto e informo que entendí adecuadamente la información que se me suministró sobre el citado proyecto de investigación, que el investigador respondió satisfactoriamente mis inquietudes y preguntas sobre ella y que dispuse del tiempo suficiente para reflexionar sobre las implicaciones de mi decisión. **Además se me fue entregada una copia de este consentimiento informado.**

De acuerdo con lo expuesto, libre, consciente y voluntariamente manifiesto que autorizo al investigador del Grupo Reproducción de la Universidad de Antioquia, identificado previamente, para que use mi muestra de semen.

Dejo expresa constancia que este consentimiento otorgado bajo información concreta y suficiente, no exime de las responsabilidades explícitas en este documento y obliga al grupo investigador a utilizar el material otorgado por mí, sólo para realizar estudios exclusivamente relacionados con el efecto de los parámetros seminales sobre el ICSI.

En constancia, firmo este consentimiento informado, en la ciudad de Medellín, a la fecha, en presencia del investigador y de dos testigos.

SU FIRMA (O HUELLA DIGITAL) INDICA QUE USTED HA DECIDIDO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN ESTE ESTUDIO HABIENDO LEIDO (O ESCUCHADO) LA INFORMACION ANTERIOR.

Participante: _____

C.C. _____

Dirección

teléfono _____

y

Huella índice derecho

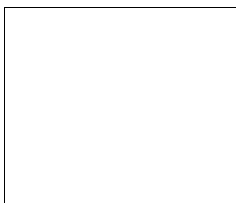


Testigo 1: _____

C.C. _____

Dirección y teléfono _____

Huella índice derecho



Firma del investigador

Huella índice derecho

