

Supervivencia espermática a las 24 horas en incubador versus ambiente y tasas de gestación en ciclos de ICSI

Sperm survival at 24 hours in an incubator versus ambient conditions and pregnancy rates in ICSI cycles

González M¹, Dorado M¹, Hebles M², Migueles B¹, Aguilera L¹, Sánchez F², Sánchez P²

¹Fundación Guadalquivir de Investigación Médica, Sevilla. ²Clínica Ginemed, Sevilla.

Resumen

La validez del test de supervivencia espermática (SST) como indicador pronóstico de fertilización no está muy clara. Existen otros criterios utilizados para valorar la función espermática como el recuento de espermatozoides móviles (REM) y la morfología. Diversos autores han relacionado una baja tasa de supervivencia espermática a las 24 horas con un fracaso o una disminución de la tasa de fecundación o de un fallo en los ciclos de FIV.

Este trabajo pretende valorar si existe una diferencia significativa entre la supervivencia espermática en condiciones ambientales y en un incubador a 37°C y al 6% de CO₂ y relacionarla con la tasa de embarazo en 50 ciclos de ICSI. Para ello hemos hecho un estudio observacional, entre los años 2005 y 2006, de 114 pacientes en cuyas muestras de semen se valoraron la supervivencia espermática a las 24 horas en condiciones ambientales versus en incubador del capacitado. De estos 114 pacientes se sometieron a ciclos de ICSI 50 de ellos, obteniéndose 24 embarazos.

Tras valorar las muestras seminales de los pacientes se observó que la supervivencia espermática de las muestras capacitadas era mayor a temperatura ambiente que en el incubador a 37°C y al 6% CO₂. En los ciclos de ICSI estudiados no se encuentra correlación entre una buena supervivencia espermática a las 24 horas (tanto en ambiente como en incubador) y la tasa de embarazo.

Palabras clave: Test de supervivencia espermática. SST. Predicción de fertilización.

Summary

The validity of sperm survival test (SST) as a pronostic indicator of fertilization is not very clear. There are other criterias in evaluating the sperm function as motile spermatozoa recount and sperm

Correspondencia: Dra. Mercedes González Martínez
C/ Farmacéutico Murillo Herrera nº 3
41010 Sevilla
mgonzalez@ginemed.es

morphology. Some authors have related a low sperm survival at 24 hours with a decrease of fertilization rates or failure in IVF cycles.

This work tries to evaluate if there are statistical differences between sperm survival in ambiental conditions and in an incubator at 37°C and 6% CO₂, and relate to pregnancy rates in 50 ICSI cycles. We carried out a study of 114 patients' semen samples, evaluating the sperm survival at 24 hours in ambiental conditions versus an incubator. 50 of this patients were subjected to ICSI cycles, obtaining 24 pregnancies. We observed that sperm survival was better in ambiental conditions than in an incubator. We haven't found any correlation between sperm survival percentage rate at 24 hours and pregnancy rates.

Key words: Sperm survival test. SST. Prediction of fertilization.

INTRODUCCIÓN

El porcentaje de éxito de un ciclo de fecundación in Vitro (FIV), cuando la causa de esterilidad en una pareja es principalmente un factor masculino, es bajo (1). Existen diversos tests para evaluar el potencial de fertilización del espermatozoide.

El tiempo durante el cual los espermatozoides permanecen móviles tras la eyaculación es un indicador importante de su función y vitalidad (2). El test de supervivencia espermática (SST) (3) se realiza para confirmar que los espermatozoides no morirán antes de llegar a su destino.

El SST se considera como indicador pronóstico, aunque no exclusivo, de la fecundación ovocitaria (4).

Otros criterios utilizados para valorar la función espermática es el recuento de espermatozoides móviles (REM) junto con la morfología (5). Diversos autores han relacionado una baja tasa de supervivencia espermática a las 24 horas con un fracaso o una disminución de la tasa de fecundación o de un fallo en ciclos previos de FIV (6).

El objetivo del presente trabajo es valorar si existe una diferencia significativa entre la supervivencia espermática en condiciones ambientales y en un incubador a 37°C y al 6% de CO₂ y evaluar el valor predictivo del SST a las 24 horas con respecto a la tasa de embarazo en 50 ciclos de Fecundación in Vitro en los que se utilizó la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Para el presente trabajo se han seleccionado las parejas que acudieron a la Unidad de Reproducción Asistida de la clínica en las cuales la causa de la este-

rilidad era un factor mixto, es decir, existía tanto un factor masculino como un factor femenino.

Se realizó un estudio observacional de 114 pacientes de FIV-ICSI que acudieron a la clínica GINEMED entre los años 2005-2006, en cuyas muestras de semen se valoraron la supervivencia espermática a las 24 horas en condiciones ambientales (25°C) versus en incubador a 37°C y al 6% de CO₂, tanto de las muestras en fresco como en el capacitado, independientemente del resto de factores seminales.

Aunque podemos estimar como normalidad más de un 75% de espermatozoides móviles tras 24 horas de incubación a 37°C, nosotros pondremos el punto de corte en el 50% de espermatozoides con motilidad lineal progresiva rápida y motilidad progresiva lenta.

Las muestras de semen fueron recogidas mediante masturbación, tras un período de abstinencia de 2 a 5 días. En todas ellas se realizó una valoración del volumen, licuefacción, pH, viscosidad, recuento espermático en fresco, motilidad, viabilidad, presencia de anticuerpos antispermatozoides, Host test y morfología. Se capacitamos por Swim-up: Esta técnica se basa en la capacidad de los espermatozoides con motilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado. El medio utilizado es Ham F-10 (GIBCO) con antibiótico (100 µl de antibiótico gevamicina por cada 10 ml de medio). En un tubo Nunc de fondo cónico (Nunc ref 347856, Denmark) se añade a 1 ml de la muestra, medio de cultivo Ham en proporción 1:1, previamente atemperado y gasificado. Se mezcla bien y se reparte en 4, 6 u 8 tubos (el número aumentará en caso de muestras oligozoospermicas), se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. y se retira el sobrenadante mediante pipeta Pasteur. A continuación se añade al precipitado 0.5 ml de medio Ham (0.1-0.2 ml en muestras oligo o astenozoospermicas), repartido entre todos los tubos, dejándolo caer suavemente por las paredes de manera que no se altere el sedimento del fondo. Se colocan los tubos en el incubador, con una incubación de 1 hora a 37°C, CO₂ 6% y humedad de

saturación. En caso de muestras oligoastenozoospermicas se pueden dejar 1.30 h o incluso más. Transcurrido este tiempo se retiran los sobrenadantes en un nuevo tubo estéril desechando el precipitado y se valoró el recuento y la motilidad en cámara Mackler.

Posteriormente las muestras obtenidas se fraccionaron en dos. Una de las fracciones se mantuvo en un incubador a 37°C y el 6% de CO₂ y la otra se dejó a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas, tras las cuales se valoró la motilidad en ambas, así como en la muestra en fresco, que se mantuvo también a temperatura ambiente.

Protocolo de estimulación

La indicación del tratamiento y el protocolo de estimulación se realizaron según criterios médicos.

El criterio para la administración de la hormona gonadotrófica humana (10000 UI HCG) (HCG Lepori (r)) es la presencia de la mayoría de la cohorte de folículos en 16 o más mm. de diámetro.

La punción folicular y aspiración ovocitaria se realizó a las 36 horas de la administración de la HCG, con sedación, usando una sonda transvaginal (GE Medical System) y agujas Labotec.

Las muestras de semen utilizadas para realizar la microinyección espermática se capacitaban por gradientes de densidad en capas de 0,3 a 1 mL al 50% y de 0,3 a 1 mL al 90%, preparados con sperm grad y Ham F-10. La centrifugación se lleva a cabo a 1100 rpm durante 20 minutos, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno con G-Sperm y G- Fert, ambos suplementados con albúmina sérica humana (HSA) a 1500 rpm, posteriormente se realiza un Swim up hasta la hora de la microinyección con un sobrenante de 25 a 200 µL de G-Fert, dependiendo de la calidad seminal. En muestras con escaso número de espermatozoides se someten a una concentración tras lavado y centrifugación a 1500 rpm con todo el volumen de muestra en G- Sperm y resuspensión en un volumen de 25 µL de G- Fert.

Previamente a la microinyección espermática, los ovocitos fueron decumulados y posteriormente aquellos que estaban en metafase II fueron microinyectados

Posteriormente fueron incubados a 37 ° C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

La fecundación se evaluó a las 16-20 horas post microinyección. Los embriones se mantuvieron en un incubador a 37°C y al 6% de CO₂ en placas de cultivo en microgotas con medio de cultivo G-1 suplementado con HSA bajo aceite (Ovoil). Tras 48 - 72 horas se seleccionaron los 2 ó 3 mejores embriones para transferir (según la clasificación de L. Veek).

Previamente a la transferencia embrionaria se realizó la medición del grosor endometrial y posición uterina mediante ecografía abdominal.

La fase lútea de las pacientes fue suplementada con la administración de 2 comprimidos vaginales cada 12 horas de progesterona natural micronizada (Ultrogestan 200 ®) hasta la semana 12 de gestación.

Análisis estadístico

Para llevar a cabo el estudio estadístico se utilizó el test One Way ANOVA, considerando niveles con significación estadística cuando el valor p<0.05.

RESULTADOS

Se analizaron 114 muestras de las cuales, independientemente del resto de parámetros seminales, 55(48,2%) presentaban un porcentaje de espermatozoides con motilidad lineal progresiva rápida (a) y motilidad progresiva lenta (b) mayor o igual al 50% en fresco, y 59 (51,8%) con recuento menor del 50% (tabla 1).

Para valorar la supervivencia espermática en el capacitado de las muestras de semen se utilizó el Mann-Whitney Rank Sum Test. Se observó una diferencia significativa cuando se valoraba la supervivencia espermática a temperatura ambiente frente a la supervivencia espermática en el incubador.

Se hizo un estudio comparativo entre la supervivencia espermática a las 24 horas en el incubador versus a temperatura ambiente. Se observa que existen diferencias significativas a favor de la supervivencia espermática a temperatura ambiente en los dos grupos de muestras (tabla 2).

Tabla 1

Comparación de la motilidad de las muestras de semen en fresco

Nº de muestras 114	a + b ≥ 50% (fresco) 55 (48,2%)	a + b < 50% (fresco) 59 (51,8%)
--------------------	------------------------------------	------------------------------------

Tabla 2

Comparación de la supervivencia espermática a las 24 horas en incubador versus a temperatura ambiente, según la motilidad que tenían las muestras seminales en fresco

	Incubador (nº de muestras)	Ambiente (nº de muestras)	p<0.05
supervivencia 24 horas	59	86	p<0.001
supervivencia 24 horas cuando a + b ≥ 50% en fresco	32	45	P=0.009
supervivencia 24 horas cuando a + b < 50% en fresco	27	41	P=0.023

De las 114 muestras seminales 50 de ellas, tras ser capacitadas, se utilizaron para realizar ciclos de ICSI. Estas muestras se dividieron en seis grupos: **grupo 1:** motilidad a + b ≥ 50% en incubador, **grupo 2:** motilidad a + b < 50% (excepto el valor 0) en incubador y **grupo 3:** a + b = 0% en incubador, **grupo 4:** motilidad a + b ≥ 50% en el ambiente, **grupo 5:** motilidad a + b < 50% (excepto el valor 0) en el ambiente y **grupo 6:** a + b = 0% en el ambiente.

Dentro del **grupo 1**, 2 de las muestras fueron sometidas a ciclo de ICSI, no obteniéndose embarazo. Dentro del **grupo 2**, 19 de las muestras fueron sometidas a ciclo de ICSI, obteniéndose una tasa de gestación del 40%. Dentro del **grupo 3**, 29 de las muestras con motilidad a + b = 0% en incubador fueron sometidas a ciclo de ICSI, obteniéndose una tasa de gestación del 60% (tabla 3).

Dentro del **grupo 4**, 5 se sometieron a ciclo de ICSI obteniéndose una tasa de gestación del 12%. Dentro del **grupo 5**, 36 se sometieron a ciclo de ICSI obteniéndose una tasa de gestación del 76%. Dentro del **grupo 6**, 9 se sometieron a ciclo de ICSI obteniéndose una tasa de gestación del 12% (tabla 4).

A pesar de que no existen diferencias significati-

Tabla 3

Comparación de las tasas de gestación en los grupos 1, 2 y 3 sometidos a ciclos de ICSI

	grupo 1 supervivencia a + b ≥ 50% incubador	grupo 2 supervivencia a + b < 50% incubador	grupo 3 supervivencia a + b = 0% incubador
Nº muestras en ciclo	2	19	29
% del total de muestras en ciclo	4%	38%	58%
Embarazos	0	10	15
% del total de embarazos	0	40%	60%
P (significativa si P < 0.05)	P = 0.383	P = 0.177	P = 0.032

Tabla 4

Comparación de las tasas de gestación en los grupos 4, 5 y 6 sometidos a ciclos de ICSI

	grupo 4 supervivencia a + b ≥ 50% ambiente	grupo 5 supervivencia a + b < 50% ambiente	grupo 6 supervivencia a + b = 0% ambiente
Nº muestras en ciclo	5	36	9
% del total de muestras en ciclo	10%	72%	18%
Embarazos	3	19	3
% del total de embarazos	12%	76%	12%
P (significativa si P < 0.05)	P = 0.383	P = 0.177	P = 0.032

vas entre las muestras en el incubador y a temperatura ambiente, se observa una mayor tasa de gestación en las muestras que presentaban mayor supervivencia a temperatura ambiente.

DISCUSIÓN

Aunque la validez del test de supervivencia espermática (SST) como indicador pronóstico de fertilización no está muy clara, diversos autores han relacionado una baja tasa de supervivencia espermática a las 24 horas con un fracaso o una disminución de la tasa de fecundación o de un fallo en los ciclos de FIV (7). En algunos de estos estudios el número de ciclos analizados fue limitado o no se tuvo la indicación para FIV en consideración (8). En otros se estudiaban un gran número de ciclos de FIV, pero se incluían parejas con graves factores de infertilidad (9).

Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran la no correlación entre la buena supervivencia espermática y las tasas de gestación en estos pacientes. Esto puede ser debido a que en los pacientes seleccionados que acudieron a la Unidad de Reproducción Asistida la causa de la esterilidad era un factor mixto, es decir, existía tanto un factor masculino como un factor femenino. Además, con la introducción de la ICSI los pacientes con un factor de infertilidad masculino severo pueden ser tratados con éxito, ya que pueden ser utilizados aquellos espermatozoides con capacidad fecundante que sin esta técnica habrían sido incapaces de fertilizar el óvulo de modo natural, mediante inseminación artificial o FIV (10).

CONCLUSIÓN

La supervivencia de las muestras seminales capacitadas a las 24 horas es mayor si dichas muestras se mantienen en condiciones ambientales que si se introducen en incubadores a 37° C y al 6% de CO₂.

No se ha encontrado correlación entre la buena supervivencia espermática transcurridas 24 horas de las muestras seminales capacitadas (tanto en incubador

como en condiciones ambientales) con las tasas de embarazo en los ciclos de ICSI estudiados.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de Ginemed.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Duncan WW, Glew MJ, Wang X, et al.:** Prediction of in vitro fertilization rates from semen variables. *Fertil. Steril.*, 1993; 59:1233-1238.
2. **Aitken RJ.:** Assessment of sperm function for IVF. *Hum. Reprod.*, 1988; 3, 89.
3. **Coccia ME, Becattini C, Criscuoli L, et al.:** A sperm survival test and in-vitro fertilization outcome in the presence of male factor infertility. *Hum. Reprod.*, 1997; 12(9): 1969-1973.
4. **Franco JL, Mauri AL, Peterson CG, et al.:** Efficacy of the sperm survival test for the prediction of oocyte fertilization in culture. *Hum. Reprod.*, 1993; 8: 916-918.
5. **Acosta AA.:** Male factor in assisted reproduction. In Diamond, M.P., De Cherney, A.H. and Overstreet, J.W. (eds), *Infertility and Reproductive Medicine. Clinics of North America*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1992; PA, P. 487.
6. **Van Uem JFHM, Acosta AA, Swanson RJ, et al.:** Male factor evaluation in in vitro fertilization: Norfolk experience. *Fertil. Steril.*, 1985; 44: 375-383.
7. **Stovall DW, Guzick DS, Berga SL, et al.:** Sperm recovery and survival: two tests that predict in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 1994; 62(6): 1244-1249.
8. **Franco J.L, Mauri AL, Peterson CG, et al.:** Efficacy of the sperm survival test for the prediction of oocyte fertilization in culture. *Hum. Reprod.*, 1993; 8: 916-918.
9. **Stovall DW, Guzick DS, Berga SL, et al.:** Sperm recovery and survival: two tests that predict in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 1993; 44: 375-383.
10. **Svalander P, Forsberg A-S, Jakobsson A-H, and Wikland M.:** Factor of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil. Steril.*, 1995; 63: 827-837.