

SALUD REPRODUCTIVA: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA EL ESTUDIO DE INFERTILIDAD MASCULINA EN CENTROS DE SALUD PÚBLICA.

Brufman, A.

Laboratorio de Reproducción Humana-Hospital Escuela “Eva Perón”.Departamento de Bioquímica Clínica, Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. E-mail: asbrufman@cimero.org.ar

La infertilidad es un problema que afecta a hombres y mujeres en todo el mundo. La O.M.S establece que el 8% de las parejas experimentan algún problema durante su vida fértil y ésta es una situación que produce sufrimiento personal y altera la vida familiar. Esto significa 2 millones de casos nuevos por año lo que representa una carga significativa para los recursos sanitarios del país. (OMS, 1995). Las causas de infertilidad se distribuyen según los siguientes porcentajes: 41% de causas femeninas, 24% masculinas, 24% compartidas y 11% ESCA (esterilidad sin causa aparente). (OMS). Al estudiar la pareja infértil se presenta el dilema de cómo evaluar adecuadamente la capacidad fértil del varón. Si bien hoy se acepta que un espermograma realizado de acuerdo a los lineamientos propuestos por O.M.S. es de gran importancia para el estudio básico del varón, los resultados que el mismo ofrece no proveen información diagnóstica o pronóstica precisa de la infertilidad masculina.

El objetivo de este proyecto es el abordaje múltiple de la infertilidad masculina. Se orienta a la puesta a punto de nuevas técnicas modificando y optimizando los reactivos para lograr un abordaje diagnóstico más sencillo y menos costoso.

Desde 1994 se han presentado proyectos acreditados y subsidiados por el Ministerio de Cultura y Educación de la Nación, con el propósito de profundizar en la funcionalidad del

espermatozoide. Entre los resultados obtenidos más relevantes cuenta la puesta a punto de un protocolo orientado al estudio del varón infértil que incluye el espermograma básico y algunos test funcionales. Entre otros logros se **diseñó y validó un kit para la determinación de anticuerpos antiespermatozoides** (Gatti, 1998) demostrándose las ventajas de dicho kit respecto de los comerciales (Solís,2000), se realizó el estudio de células no espermatozoides (Gatti,2000), la relación entre leucocitospermia e infecciones genitales en hombres infértiles (Solís,2000) , en el análisis de la dispermia en pacientes con varicocele (Solís,2001) y se diseñó un modelo *in vitro* de interacción moco cervical-semen(Brufman, 2004).

Desde hace tiempo se reconoce que la asistencia psicológica es una parte importante del tratamiento de la pareja infértil. Todo servicio de Reproducción debería contar con un Equipo de Salud Mental y además no existe información amplia acerca de la prevalencia de enfermedades de transmisión sexual en nuestra comunidad (OMS, 1995).

A pesar de que las terapias actuales han aumentado la oportunidad de concepción, estas soluciones se desarrollan en ausencia de una definición etiológica o fisiopatológica. Por lo que la infertilidad masculina, se sigue considerando "idiopática "en gran parte de los casos. La profundidad del estudio de cada miembro de la pareja varía en cada Centro de Salud y generalmente no está al alcance de la población hospitalaria. *En muchas ocasiones la información que se consigna es excesiva e irrelevante, o a veces insuficiente, para el correcto diagnóstico y tratamiento.*

Ante este escenario clínico, surgen preguntas prácticas:

- 1-¿Cuáles son los pasos diagnósticos a desarrollar para definir una modalidad terapéutica?
- 2-¿Cuál es la terapia con mejor relación costo-beneficio para cada caso particular?

El objetivo no es solamente teorizar sobre las causas de infertilidad, sino estandarizar estudios para ofrecer mayores chances o posibilidades de procreación natural a la pareja infértil previas al intento de fertilización asistida.

Los procedimientos estandarizados ayudan a clarificar muchas cuestiones, a mejorar la precisión diagnóstica y a la evaluación de los tratamientos en cuanto a su efectividad, riesgo y costo, permitiendo así el acceso a Programas de Salud Reproductiva a la población de escasos recursos que concurre a los Centros de Salud Pública. Si se disminuye el interés por elucidar y entender las causas de infertilidad masculina llegaríamos a una lamentable demora en la adquisición del conocimiento científico específico del área impidiendo el futuro desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas.

DISEÑO, METODOLOGIA Y RESGUARDOS ETICOS

MUESTRAS

Se trabajó con muestras de semen y suero de la pareja de pacientes que consultaron por infertilidad en el Hospital Escuela "Eva Perón", **previo consentimiento escrito de los pacientes que intervienen en el protocolo de trabajo y con autorización y aval de los profesionales tratantes según la declaración de Helsinski.** Se tiene conocimiento de la **Ley de Protección de datos personales (25.326)** recientemente promulgada y publicada en el Boletín Oficial. **La Res 5330/97 de ANMAT no compete al plan de trabajo Laboratorio de Reproducción** porque, de acuerdo a los objetivos enunciados, la metodología es de tipo diagnóstica.

MÉTODOS

Las instrucciones para la recolección de la muestra se entregan al paciente por escrito junto con el consentimiento quién debe traerlo cuando regresa a la consulta, momento en que se realiza la extracción de sangre de la pareja. En todas las muestras de semen se realiza

espermograma completo según los criterios establecidos por OMS en 1999. Las muestras son utilizadas para espermograma básico y test funcionales. Algunas de las pruebas realizadas son: Determinación de la concentración de Macrófagos con tinción de Rojo Neutro, morfología espermática con Papanicolaou y presencia de anticuerpos antiespermáticos con el test de aglutinación mixta TAC II (Gatti, 1998). Los ensayos diagnósticos especializados más utilizados son Naranja de acridina para integridad del ADN y Test hiposmótico (swelling test) para integridad de membrana (Jeyedran, 1984).

Los test experimentales incluyen: Análisis de ROS (especies reactivas del oxígeno) (Calamera, 1998) y estudios de antígenos ABH de la membrana espermática (Brufman, 2004)

Tinción de Rojo Neutro: En cámara de Neubauer se determina la concentración de macrófagos por mL de semen con solución de Rojo Neutro. En un semen fresco normal no puede haber más de 0.6×10^6 Macrófagos activados por mililitro de semen.

Test de Naranja de Acridina: (Método modificado): Se utiliza una solución de Naranja de Acridina al 0,04% en PBS, que permite observar al microscopio de fluorescencia el estado del DNA del espermatozoide.

Morfología espermática: Para estudiar la morfología espermática se practica tinción Papanicolaou y observa en microscopio óptico, siguiendo las pautas dadas por OMS que considera que cuando la morfología espermática presenta menos del 15% de formas normales el potencial fértil del varón disminuye (OMS, 1999).

Anticuerpos antiespermáticos (AAE)- Test TAC II: Es un test directo de aglutinación mixta. Se incuba suspensión de eritrocitos sensibilizados con IgG. , antisuero de conejo IgG- Fc antihumano y semen humano. Se determina el porcentaje de espermatozoides unidos a los eritrocitos sensibilizados con IgG. Consideramos presencia de AAE

(aglutinación positiva) cuando más del 25% de los espermatozoides están unidos a los eritrocitos. Se realiza la técnica indirecta con suero del hombre y la mujer (Gatti, 1998)

Test hiposmótico: Evalúa la capacidad del espermatozoide maduro, con membrana intacta de incorporar agua del medio ambiente hiposmótico(150mOsm/ml)al que es sometido. Si la membrana plasmática está funcionalmente íntegra se observan más del 60% de espermatozoides con colas hinchadas.

Antígenos del ABO: Mediante técnicas de inhibición de la hemaglutinación, se investiga la presencia de antígenos del grupo sanguíneo ABO en la membrana del espermatozoide. (Solis, 2001)

Sustancias oxígeno reactivas(ROS):Sperm stress test: Incubación de semen a 40° para inducir la formación de ROS.(Calamera 1998)

RESULTADOS

Se aportaron protocolos y criterios de fácil transferencia a los especialistas en el campo de la reproducción para un abordaje mas completo del problema de la infertilidad. Se optimizaron técnicas de estudio de semen descritas por otros autores y propias modificando y mejorando los reactivos para lograr un abordaje diagnóstico más sencillo y menos costoso al alcance de la población hospitalaria.

Se correlacionaron pruebas funcionales espermáticas con los parámetros clásicos para proporcionar a los Servicios derivantes mejor información pronóstica y diagnóstica.

En base a los resultados obtenidos se desarrolló y coordinó en el Hospital Escuela "Eva Perón " un Servicio de Salud Reproductiva integrado por los Servicios de Urología, Ginecología, Microbiología y Salud Mental. El mejoramiento de la relación costo-beneficio permitió convenios con otros entes públicos o privados interesados en el tema.

DISCUSIÓN

A pesar de los avances, el análisis de semen tiene un rol fundamental en la evaluación de la calidad espermática. Se sabe que la evaluación de una sola característica no predice la capacidad fecundante debido a la compleja naturaleza de la producción, almacenamiento y transporte de los espermatozoides a través del tracto genital masculino y a la complejidad del proceso de fertilización. Sin embargo, se han realizado progresos significativos en el desarrollo de técnicas que miden distintos aspectos del espermatozoide para obtener mayor conocimiento en cuanto a las características funcionales y predicción de la fertilización.

En el diagnóstico de la infertilidad masculina se evalúan diversas características del semen. El protocolo de estudio en el varón de la pareja infértil, tiene como base el espermograma. La O.M.S. categoriza a los estudios del semen en básico, especializado y experimental. Dentro del análisis básico se encuentran el estudio físico del semen (viscosidad, pH, licuefacción, aspecto, motilidad), células no espermatozoides, aglutinación, morfología, recuento espermático (concentración), presencia de anticuerpos y test de vitalidad. Los test opcionales incluyen: índice de teratozoospermia, cultivo de semen, bioquímica del plasma seminal, análisis computarizado y test de hámster (OMS, 1999). Los ensayos diagnósticos especializados más utilizados son Azul de anilina y Naranja de acridina para maduración cromatínica e integridad del ADN y Test hiposmótico (swelling test) para integridad de membrana (Acosta, 1996). Los test experimentales incluyen: Análisis de ROS (especies reactivas del oxígeno) (Aitken, 1998), unión a la zona pelúcida humana, reacción acrosomal y morfología por análisis computarizado. Diversos trabajos atribuyen un rol protagónico en la capacidad fecundante del espermatozoide, a la integridad de la membrana y del ADN, y al estado de condensación nuclear (Irvine, 2000).

Todos estos test deben tener la capacidad potencial de ayudar a una decisión clínica en Medicina Reproductiva

Una conciencia incrementada de que la infertilidad es una condición tratable lo demuestra la cantidad de visitas a los especialistas de infertilidad en los últimos años, se estima que el factor masculino está presente en el 40 a 50% de los casos, esto lleva a la necesidad de una correcta evaluación andrológica. La proporción de casos en que el factor masculino es la razón de la imposibilidad de concebir es bien conocida, pero es dificultoso el problema del diagnóstico preciso (Amann, 1989).

Las opciones terapéuticas actuales son extremadamente exitosas en permitir a las parejas a acceder a la concepción. Las opciones de tratamiento incluyen un gran número de procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos e intervenciones farmacológicas y médicas, como técnicas de baja y alta complejidad de Reproducción asistida (Oehninger, 2001).

Hasta el momento, la Fertilización in vitro (FIV), transferencia embrionaria, la inyección intracitoplasmática (ICSI) en casos moderados a severos, constituyen caminos válidos y exitosos para tratamientos eficientes son pero son intervencionistas y costosos.

En consecuencia es fundamental desarrollar una investigación para establecer las causas (y prevención) de la infertilidad masculina para llegar desarrollar terapias simples y seguras. Aún cuando se han realizado considerables progresos en el conocimiento de la gameta masculina y su interacción con el ovocito, se necesita mucho trabajo para lograr objetividad y estandarización de los métodos de diagnóstico andrológico. Es necesaria mucha información para definir definitivamente cuáles test (en particular test funcionales y bioquímicos) son mejores predictores de la calidad espermática y cómo se correlacionan con la capacidad fecundante in vivo, inseminación intrauterina (IIU),FIV e ICSI. Métodos simplificados, eficientes y menos costosos deben ser desarrollados. Una gran proporción de hombres infértiles podrán ser tratados con terapias urológicas, médicas o fertilización asistida de baja complejidad, otras necesitarán ICSI. A pesar de que el ICSI constituye una terapia formidable en muchos casos la identificación de defectos espermáticos específicos

permitirá utilizar la terapia más simple y directa posible. Los avances de la medicina, bioquímica y biología molecular en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diferentes patologías andrológicas tiene como objetivo mejorar la calidad de vida de los pacientes y contribuir a la solución de problemas de infertilidad aún no resueltos.

Este trabajo fue premiado con la Beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia del Ministerio de Salud de la Nación, período 2004-2005

BIBLOGRAFÍA

1. Acosta, AA; Kruger, TF. (eds.) (1996). Human spermatozoa in Assisted Reproduction. Parthenon Publishing Group, New York. U.S.A
2. Aitken,RJ; Gordon,E,Harkiss,D y cols.(1998)Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.Biol.Reprod.; 59:1037-1046.
3. Amann R.P. (1989). Can the fertility potential of a semen sample be predicted accurately?. J. Androl. 10: 89-98
4. Bouvet BR, Brufman AS, Paparella CV y cols.(2003) Macrófagos en semen humano. EA.Arch.Esp.Urol.56(9): (983-987).
5. Brufman A, Bouvet B, Gatti V, Solis E (2004). Interacción *in vitro* semen- moco cervical ABO incompatible. Reproducción Humana Rev. De la Federación Latinoamericana de Sociedades de Esterilidad y Fertilidad (FLASEF). 4(3): 7-14
6. Calamera JC, Doncel GF, Olmedo SBy cols.(1998)Modified sperm stress test: a simple assay that predicts sperm-related abnormal in-vitro fertilization. Hum Reprod. Sep;13(9):2484-8.
7. Gatti ,V.; Solis ,E.; Brufman, A.; Bouvet ,B. (1998). Comparative results of two sperm antibody assay in infertile patients. Validation of a new technique. Act.Urol.Ital.12 (6): 321-323.

8. Irvine,DS;Twigg,JP;Gordon,EL(2000).DNA integrity in human spermatozoa:relationship with semen quality.J.Androl,21:33.
9. Jeyedran, R.S. y cols. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod. Fert. 70: 218-219.
10. Manual de la OMS para el estudio estandarizado y el diagnóstico de la pareja infértil.(1995). Editorial Médica Panamericana S.A. Bs.As. Argentina
11. Oehningher,S (2001) Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. J Androl. Nov-Dec;21(6):814-21. Review.
12. Solis ,E.; Gatti ,V.; Brufman,A.; Bouvet .B.; Provenzal ,O. (2000). Ventajas de un nuevo kit para la determinación de autoanticuerpos antiespermáticos. Arch. Esp. de Urol. 53 (4): 363-366.
13. Solis EA, Gatti VN, Bouvet BR, Brufman AS.(2001) Correlación entre glicolípidos ABH en espermatozoides y test funcionales” Feldman R, Bottai H. Arch Esp Urol. 2001 Apr; 54(3):199-203. .
14. Solis, E.; Brufman, A.; Iori,L.; Bouvet, B.; Gatti, V. (1999). Modelo in vitro de interacción semen-moco cervical ABO incompatible. Rev. de la Sociedad Argentina de Andrologia. 8 (2):24-25.
15. Solis, E.; Gatti,V.; Bouvet, B.; Brufman,A.; Provenzal,O.; Feldman ,R. (2000). Células redondas en semen e infecciones genitales .Arch .Esp. de Urol. 53 (2):101-105
16. WHO LABORATORY MANUAL for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1999; Cambridge.