

# Estudio de la presencia de leucocitos en muestras de semen posvasectomía

María Somolinos<sup>a</sup>, Carlos Aulesa<sup>a</sup>, María Cabrera<sup>a</sup>, Isabel Caragol<sup>b</sup>, Irene Planells<sup>c</sup> y Emilio Zahonero<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorios Clínicos. Unidad de Seminología. Servicios Clínicos Centrales. Hospital Universitario Valle de Hebrón. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Laboratorio de Inmunología. Unidad de Inmunología. Servicios Clínicos Centrales. Hospital Universitario Valle de Hebrón. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Servicio de Microbiología. Unidad de Urocultivos y Genitales. Servicios Clínicos Centrales. Hospital Universitario Valle de Hebrón. Barcelona. España.

<sup>d</sup>Unidad de Cirugía Sin Ingreso (UCSI). Parque Sanitario Pere Virgili. Barcelona. España.

## RESUMEN

**Objetivo:** Estudio de la presencia de leucocitos en el semen (leucospermia) de sujetos sometidos a vasectomía.

**Métodos:** Las muestras obtenidas fueron analizadas en la Unidad del Laboratorio de Andrología según protocolo de la British Andrology Society (2002). De las 137 muestras analizadas, 33 (24%) cumplían los criterios de leucospermia propuestos por la OMS y se enviaron al Laboratorio de Microbiología para su estudio. Otras 24 muestras se remitieron al Laboratorio de Inmunología para realizar un estudio diferencial de la población leucocitaria. Se determinó también la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en 23 muestras. Asimismo, se realizó el estudio microbiológico de un grupo control de muestras sin leucospermia.

**Resultados:** El cultivo microbiológico de estas muestras dio como resultado: negativo en el 72,7% de los casos, presencia de abundantes colonias de flora grampositiva aerobia en el 9,1% de los casos y presencia de colonias con significado patológico en el 18,2% de los casos. Los microorganismos patológicos aislados fueron: *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* y *Klebsiella oxytoca*. El estudio inmunológico mostró un predominio de leucocitos polinucleares. El estudio de los anticuerpos antiespermatozoides dio un 4,3% de muestras positivas.

**Conclusiones:** Descartado el componente infeccioso, se plantea un componente inflamatorio subclínico secundario a la vasectomía como responsable de la presencia de leucocitos en el semen.

**Palabras clave:** Vasectomía. Leucospermia. Semen. Leucocitos.

## ABSTRACT

**Study of the presence of leukocytes in postvasectomy semen samples**

**Aim:** To evaluate the presence of leukocytes in semen (leukospermia) of patients who had undergone vasectomy recently.

**Methods:** The semen analysis was performed according to the British Andrology Society guideline (2002). Samples of 137 subjects who had undergone vasectomy 4 months previously were analyzed. 33 (24%) met the WHO leukospermia criteria and were sent to the microbiology lab for study. 24 samples were sent to the immunology lab for immunophenotypic analysis. Presence of anti-sperm antibodies was also determined in 23 samples. Microbiologic study was also carried out in samples without leukospermia, that were used as control group.

**Results:** The results of the microbiological culture of the samples showed: negative culture in 72.7% of the samples, abundant colonies of aerobic gram-positive bacteria in 9.1% of the samples and presence of pathological bacterial colonies in 18.2% of the samples. The species isolated were: *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* y *Klebsiella oxytoca*. The immunological study showed a predominance of polymorphonuclear leukocytes. 4.3% of the samples had a positive titer of anti-sperm antibodies.

**Conclusion:** An infectious etiology was ruled out and therefore a postvasectomy subclinical immunological inflammatory response was considered as the cause of leukospermia in the patients studied.

**Key words:** Vasectomy. Leukospermia. Semen. Leukocytes.

**Correspondencia:** Dr. C. Aulesa.  
Unidad de Seminología. Hospital Infantil.  
Ciudad Sanitaria Valle de Hebrón.  
Paseo Valle de Hebrón, 119-129.  
08035 Barcelona. España  
Correo electrónico: caulesa@vhebron.net

## INTRODUCCIÓN

El significado de la presencia de leucocitos en el líquido seminal es un tema ampliamente discutido por numerosos autores. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se entiende por leucospermia la presencia de más de  $1 \times 10^6$  de células blancas por mililitro de semen<sup>1</sup>. Hay evidencias acerca de la asociación entre la presencia de leucospermia y la disminución de la calidad del semen, y se observa leucospermia en el 10-20% de los varones infértiles<sup>2-7</sup>. Así, entre las causas posibles de leucospermia, la explicación más aceptada es la presencia de un proceso inflamatorio o infeccioso que cursaría de manera subclínica<sup>2,3,6,8</sup>. No obstante, no siempre se encuentra esta correlación<sup>6-8</sup>. Entre otros posibles factores etiológicos, es posible que la abstinencia sexual influya en la aparición de leucospermia, ya que cuanto más tiempo permanezcan los espermatozoides en el epidídimo, más macrófagos y granulocitos serán atraídos por los espermatozoides envejecidos, ocasionando un aumento de la presencia de leucocitos en el eyaculado<sup>2</sup>.

Con relación a la vasectomía, diversos estudios demuestran que los varones vasectomizados presentan cifras más bajas de leucocitos en semen que los no vasectomizados. De hecho, se encuentran valores de leucocitos entre un 70 y un 80% menores en varones vasectomizados que en varones no vasectomizados<sup>2</sup>. Sin embargo, con frecuencia se demuestra la presencia de parámetros anormales en el análisis de semen y disfunción espermática en pacientes sometidos a una vasectomía reversa o vasovasostomía. En muchos de estos casos se encuentran en semen, como principales candidatos del origen de esta disfunción espermática, altos valores de especies reactivas del oxígeno (ROS), y los leucocitos seminales están asociados a este incremento de ROS, aunque no de una manera absoluta<sup>9</sup>.

En el Laboratorio de Andrología del complejo hospitalario Valle de Hebrón, se lleva a cabo el control seminal posvasectomía que, actualmente, se considera como el mejor método para valorar la efectividad de la técnica quirúrgica<sup>10-12</sup>. En nuestro laboratorio se realizan más de 400 controles analíticos posvasectomía al año de pacientes procedentes del hospital y de otros centros de cirugía ambulatoria, y constituye el laboratorio de referencia de su área sanitaria provincial.

Durante la realización de los controles posvasectomía siguiendo el protocolo establecido por la British Andrology Society<sup>13</sup>, se ha observado la presencia de leucocitos en múltiples muestras de semen. Al relacionar este hallazgo con los conocimientos actuales acer-

ca de la etiología de la leucospermia, se planteó la incógnita del origen y significado de la presencia de estos leucocitos en el semen de los pacientes vasectomizados.

El objetivo de este estudio fue intentar conocer la etiopatogenia de esta leucospermia en las muestras de semen de pacientes vasectomizados y comprobar si tenía algún significado clínico relevante.

## MÉTODOS

Se analizaron un total de 137 muestras de semen para control posvasectomía, que llegaron a nuestra unidad en un período de 2 meses. Ningún paciente presentaba síntomas de infección genitourinaria clínicamente activa. Las muestras de semen se recogieron tal y como especifica la British Andrology Society<sup>13</sup>. De estas muestras, se alicuotaron inmediatamente 500  $\mu$ l que se depositaron en tubos estériles para su posterior estudio microbiológico, si procedía.

### Análisis seminal

En primer lugar se realizó un examen del semen en fresco, depositando una alícuota de 10  $\mu$ l en un portaobjetos termostatzado a 37 °C, con un cubreobjetos de 22  $\times$  22 mm. Se examinaron de 20 a 30 campos con un microscopio óptico para detectar la presencia de espermatozoides y/o la presencia de otros elementos formes como leucocitos o células germinales.

Las muestras se centrifugaron a 500 g durante 10 min y el sedimento se examinó de la misma manera que en fresco. En los casos en los que se observó la presencia de abundantes leucocitos, se procedió a la tinción de éstos para su identificación y diferenciación con el equipo de tinción LeucoScreen® (Fertipro lab) para hacer el diagnóstico diferencial de los leucocitos con las demás células que puede contener el semen (células germinales, *rounds cells*, etc.). Asimismo, se analizaron las muestras de semen con un citómetro de flujo Sysmex UF-100® para orinas (Roche Diagnostics) para confirmar el diagnóstico de leucospermia (desde  $1 \times 10^6$  leucocitos/mm semen).

Una vez seleccionadas las muestras que cumplían los criterios establecidos de leucospermia, se procedió al análisis microbiológico e inmunológico como se describe a continuación.

### Análisis microbiológico

Se seleccionaron las muestras positivas para leucospermia, y se remitieron a microbiología las alí-

cuotas separadas en los tubos estériles reservados inicialmente.

Las muestras se sembraron en agar sangre y en medio de MacConkey con asa calibrada de 1/100. Las placas de agar sangre se incubaron en atmósfera aerobia con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°, y las placas de MacConkey en atmósfera aerobia a 37°. La primera lectura se efectuó a las 24 h, y la lectura definitiva a las 48 h de incubación. Se consideró valorable el crecimiento de microorganismos posibles patógenos, distinguiéndolos de la flora sin significado patológico, frecuente en este tipo de muestra. En los cultivos positivos valorables se aislaron enterobacterias. La identificación de los microorganismos se realizó por una galería de pruebas bioquímicas diseñadas para este fin. Las pruebas de sensibilidad se realizaron por el método de Kirby-Bauer (disco-difusión) en medio de Mueller-Hinton, con un inóculo equivalente al patrón de turbidez de MacFarland 0,5. Para la investigación de *Mycoplasma* las muestras se sembraron en medio sólido A7B para *Mycoplasma*. Se incubaron durante 48 h en atmósfera anaerobia. La lectura se realizó en microscopio a 10 × 10 aumentos.

### Estudio estadístico

Los resultados obtenidos para las muestras con leucospermia fueron comparados con el grupo de control mediante un análisis de contingencia aplicando la prueba de  $\chi^2$  con un nivel de significación de  $p = 0,05$  y entre sí para estudiar la influencia del lugar de realización de la cirugía y de la fecha su realización.

### Análisis inmunológico

Al llegar al Laboratorio de Inmunología, las muestras de semen se centrifugaron durante 5 min a 300 g, se lavaron 2 veces con tampón PBS (pH 7,2) frío y las células, resuspendidas en un volumen mínimo de PBS (350 µl), se repartieron entre los tubos con una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. Tubo 1: CD45FITC y CD14PE; tubo 2: CD3FITC, CD8PE, CD45PerCP, CD4APC, y tubo 3: CD3FITC, CD16+CD56PE, CD45PerCP, CD19APC (Becton Dickinson, San José, California). Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente y preservadas de la luz, las células se lavaron con 2 ml de PBS y se resuspendieron para su adquisición en un citómetro FACSCalibur® (Becton-Dickinson) con 2 láseres de argón y diodo rojo, respectivamente, que permiten la utilización de 4 colores simultáneamente. El *software* que se utilizó para la adquisición y análisis de las muestras fue el CELLQuest®.

El primer tubo se utilizó para conocer la distribución de las poblaciones leucocitarias, mediante los parámetros tamaño y granularidad, intensidad de CD45 y la expresión de CD14 para identificar monocitos. Los tubos 2 y 3 se adquirieron con el umbral en CD45 para seleccionar la población de linfocitos. Mediante ventana electrónica en dicha población, y con los distintos marcadores de inmunofenotipo, se obtuvo la distribución de subpoblaciones linfocitarias en cada muestra: linfocitos T (CD3+) colaboradores (CD4+), upresores/citotóxicos (CD8+), linfocitos B (CD19+) y células NK (CD3-CD16+CD56+).

El estudio de la presencia de anticuerpos antiespermatozoides se realizó con el equipo SpermMar Test IgG® (Fertipro NV) realizando el test de SpermMar indirecto con plasma seminal de los pacientes y espermatozoides frescos de un paciente control normal.

## RESULTADOS

De las 137 muestras analizadas en este estudio, 33 (24%) cumplían los criterios de leucospermia propuestos por la OMS.

El cultivo microbiológico de estas muestras dio como resultado: negativo en el 72,7% de los casos, presencia de abundantes colonias de flora grampositiva aerobia en el 9,1% y presencia de colonias con significado patológico en el 18,2%. Los microorganismos potencialmente patológicos aislados fueron: *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus viridans*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii* y *Klebsiella oxytoca* (tabla 1).

El análisis de contingencia para los resultados del estudio microbiológico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con leucospermia y el grupo control ( $p = 0,58$ ).

El estudio inmunológico se realizó con 24 muestras, y se descartaron las que tenían células no viables o en las que el número de linfocitos fue insuficiente para realizar el estudio diferencial. Los resultados del estudio revela-

TABLA 1. Resultado del cultivo microbiológico

Cultivo	n = 33	(%)
Negativo	24	72,7
Positivo	9	27,3
<b>Organismo aislado</b>		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1	3,03
<i>Streptococcus viridans</i>	1	3,03
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3,03
<i>Morganella morganii</i>	2	6,06
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	3,03
Flora grampositiva aerobia	3	9,09

ron la siguiente composición diferencial media de los leucocitos: 66,9% de neutrófilos, 21,45% de monocitos y 3,06% de linfocitos, de los cuales el 92,07% eran CD3+, el 61,46% CD3+CD4+ y el 32,38% CD3+CD8+, con un cociente CD4/CD8 de 2,88, el 2,07% CD19+ y el 3,07% CD3-CD16+CD56+ (NK).

El estudio de la presencia de anticuerpos antiespermatozoides realizado a 23 pacientes que presentaban una leucospermia significativa mostró 1 paciente positivo (4,3%) de las 23 muestras estudiadas.

El análisis de contingencia no mostró relación estadísticamente significativa entre la presencia de leucospermia y el lugar donde se realizó la técnica quirúrgica ( $p = 0,77$ ), ni tampoco con la fecha de realización de la intervención ( $p = 0,10$ ).

## DISCUSIÓN

Se constata el alto porcentaje de muestras que presentan leucospermia (24%) como consecuencia de la vasectomía.

Los resultados obtenidos en el estudio microbiológico no permiten establecer una hipótesis infecciosa como origen de la leucospermia, ya que aunque se encontraron colonias potencialmente patógenas en algunas muestras, éstas no fueron estadísticamente significativas. En el estudio inmunológico se observa un predominio de polinucleares (el 66,9% de los leucocitos del semen) y un predominio de células T, con un cociente CD4/CD8 de 2,8 en los linfocitos.

Descartado el origen infeccioso de la leucospermia, se presentan otras posibles explicaciones de su presencia en el semen de varones posvasectomizados. Es frecuente que los pacientes vasectomizados desarrollen anticuerpos antiespermatozoide. De hecho, la vasectomía constituye una agresión que genera una respuesta inflamatoria que estimula a los leucocitos dentro de los vasos deferentes y a la inmunidad humoral. Así, después de realizar una vasectomía se produce un aumento de los inmunocomplejos circulantes, seguido de un descenso progresivo hasta su desaparición hacia el tercer mes posvasectomía<sup>11,14</sup>. Los estudios complementarios de anticuerpos antiespermatozoides realizados muestran que sólo 1 paciente de los 23 estudiados (4,3%) presentó anticuerpos positivos, por lo que parece irrelevante la presencia de los anticuerpos antiespermatozoides en la etiopatogenia de la leucospermia.

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos refleja que la etiopatogenia de la leucospermia sería compatible con un componente inmunológico inflamatorio, cuya duración está por determinar y que cursaría de una manera subclínica. Como se ha comprobado, en algunos pacientes persiste la leucospermia a los 6-7 meses de la vasectomía, por lo que con la experiencia de este trabajo se propone el estudio de estas leucospermias hasta el año después de la vasectomía en los pacientes que sea posible, para dilucidar si al año de la intervención todavía persiste la leucospermia o el componente inflamatorio de la vasectomía ha remitido con la desaparición de los leucocitos.

## Bibliografía

1. World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
2. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995;63:1143-57.
3. Esfandiari N, Saleh RA, Abdoos M, Rouzrokh A, Nazemian Z. Positive bacterial culture of semen from infertile men with asymptomatic leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med*. 2002;47:265-70.
4. Oliva A, Multigner L. Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2006;85:240-3.
5. Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril*. 1996;66:822-5.
6. Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Antibiotic therapy and leukocytospermia: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril*. 1995;63:142-7.
7. Trum JW, Mol B, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, et al. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril*. 1998;70:315-8.
8. Cottell E, Harrison RF, McCaffrey M, Walsh T, Mallon E, Barry-Kinsella C. Are seminal microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil Steril*. 2000;74:465-70.
9. Shapiro RH, Muller CH, Chen G, Berger RE. Vasectomy reversal associated with increased reactive oxygen species production by seminal fluid leukocytes and sperm. *J Urol*. 1998;160:1341-6.
10. Sivardeen KAZ, Budhoo M. Post vasectomy análisisanalysis: call for uniform evidence-based protocol. *Ann R Coll Surg Engl*. 2001;83:177-9.
11. Fernández C, Navarro Casado L, Fuster Lluch O, et al. Espermiograma para el control de la vasectomía. *An Clin*. 2005;30:9-19.
12. Christensen RE, Maples DC Jr. Postvasectomy semen analysis: are men following up? *J Am Board Fam Pract*. 2005;18:44-7.
13. Hancock P, McLaughlin E. British Andrology Society guidelines for the assessment of post vasectomy semen samples (2002). *J Clin Pathol*. 2002;55:812-6.
14. McDonald SW. Cellular responses to vasectomy. *Int Rev Cytol*. 2000;199:295-339.