

ORIGINAL

Efecto de la cámara de recuento utilizada sobre los parámetros espermáticos, analizados con el ISASv1®

Carles Soler^{a,*}, María del Carmen Fuentes^b, María Sancho^c, Almudena García^c, Manuel Núñez de Murga^a y Javier Núñez de Murga^a

^aDepartamento de Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia, Valencia, España

^bDepartamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante, España

^cProjectes i Serveis, R+D, S.L., Paterna, Valencia, España

Recibido el 17 de mayo de 2012; aceptado el 28 de junio de 2012

PALABRAS CLAVE

Cámara de recuento;
Espermatozoide;
Concentración;
Movilidad;
CASA

Resumen

Introducción: El uso de las cámaras de recuento condiciona los valores de concentración y movilidad espermática debido a su tipo de carga (capilaridad o desplazamiento de la gota) y a la altura que presenten. Recientemente, se han introducido nuevas cámaras, tanto desechables (ISAS®D4C) como reusables (Spermtrack®) con diversas alturas en cada caso.

Objetivo: El objetivo del presente trabajo es validar su uso, analizando diversos parámetros espermáticos con un sistema CASA, el ISASv1®.

Material y método: Se analizaron muestras de donantes voluntarios (10 para las desechables y 5 para las reusables), analizando el efecto del tipo de cámara, de la altura, del tiempo de carga y del tiempo de análisis.

Resultados: Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas con el tiempo de carga para las cámaras reusables ni con el tiempo de análisis en ninguna de las cámaras.

Discusión: La cámara reusable de 10 µm y las desechables de 10, 16 y 20 µm no mostraron diferencias entre sí, mientras que la reusable de 20 µm presentó resultados significativamente diferentes con respecto a las demás, por lo que su uso (siguiendo la recomendación de la Organización Mundial de la Salud) debe hacerse teniendo en cuenta este hecho.

Conclusión: Las nuevas cámaras ofrecen un resultado muy homogéneo, con independencia del tiempo de carga o de análisis.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia

Correo electrónico: csolerv@uv.es (C. Soler).

KEYWORDS

Counting chamber;
Spermatozoon;
Concentration;
Motility;
CASA

Effect of counting chamber on seminal parameters, analyzing with the ISASv1®**Abstract**

Introduction: The use of counting chambers conditions the sperm concentration and motility values by their type of filling (capillary or drop displacement) and chamber height. We have recently introduced new chambers, both disposable (ISAS®D4C) and reusable (Spermtrack®), with different heights in each case.

Objective: This study has aimed to validate its use by analyzing different sperm parameters with a CASA system, that is, the ISASv1®.

Material and method: Samples from volunteer donors (10 for the disposable and 5 for reusable), analyzing the effect of chamber type, height, filling and analysis time, were used.

Results: The results obtained showed no differences within the filling time for the reusable chambers, or the analysis time in any cases.

Discussion: The 10 microns reusable chamber and disposable, 10, 16 and 20 microns showed no differences between them. However, the reusable 20 microns showed significantly different results, so its use (as recommended by WHO) should be taking this into account. Conclusion: The new chambers offer very consistent results, independent of filling or time of analysis.

© 2012 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Desde que comenzaron a realizarse los estudios sobre calidad seminal, se puso de manifiesto que en la evaluación del semen, la concentración y la movilidad espermática tienen un gran significado en la valoración seminal. Por su parte, el uso de sistemas CASA implica un avance en la estandarización de dichas valoraciones, pero requiere de la puesta a punto de protocolos adecuados que optimicen sus resultados¹.

Hasta la fecha, se ha considerado el uso de los hemocitómetros y, más concretamente, de la cámara Neubauer Improved como el sistema estándar y de referencia para la valoración de la concentración². Este hecho obedece más a una cuestión de "tradición" que a una auténtica reflexión metodológica, como más adelante trataremos. Además, para la calibración de dichas cámaras y otras que han aparecido en el mercado, se han utilizado esferas de látex (QC-Beads, Bioscreen Icn. NY, EE. UU.), con concentraciones supuestamente definidas³. En todo caso, se ha demostrado que hay diferencias sensibles entre cámaras Neubauer de una misma marca, y las esferas referidas muestran unas oscilaciones en su "composición" que llegan a valores de 34-46 y 16-24 para las concentraciones altas y bajas, respectivamente, según las indicaciones del propio fabricante.

Estos datos sirven para evidenciar que los "supuestos" estándares no pueden ser considerados como tales, sino de una forma muy relativa.

Por ello, consideramos que no es posible adjudicar a un sistema de recuento el calificativo de "óptimo" al que hacer referencia, sino que, en cada caso, es necesario analizar los procesos físicos asociados al tipo de cámara en cuestión, valorar los posibles errores/limitaciones de cons-

trucción y centrarse en la repetitividad del análisis realizado³.

Así pues, hay 2 formas básicas de llenar una cámara de recuento: por capilaridad y por desplazamiento de la gota. Del primer tipo existen reusables (Neubauer, Bürker, Thoma, ISAS®R2C...) o desecharables (Leja®, Microcell®, Cell-Vu®, ISAS®D4C...). De forma similar, de las del segundo tipo hay reusables (Makler®, Spermtrack®) o desecharables (porta y cubre).

Pese a la relativamente extensa bibliografía referida al cálculo de la concentración y el uso de diversas cámaras de recuento, hay escasas referencias que valoren estas diferentes formas de carga de una forma adecuada. Es por ello que en el presente trabajo trataremos de incidir en dichas diferencias (utilizando las nuevas cámaras ISAS®D4C y Spermtrack®), evaluando además, cuál debe ser el protocolo de uso para su optimización con un sistema CASA (el ISAS®v1).

Material y método

Obtención de las muestras

En total, se evaluaron muestras correspondientes a 10 donantes voluntarios, con informe consentido del uso de los datos para el presente trabajo científico. Las muestras se obtuvieron por masturbación tras un período de abstinencia eyacularia de 2-3 días. El estímulo erótico fue homogéneo, consistiendo en la misma iconografía fotográfica. Para la recogida, se utilizó un bote de licuefacción (ISAS® Liquefaction Cup, Proiser R+D, S.L., Paterna, Valencia, España).

Figura 1 Cámaras utilizadas: A) Spermtrack®. B) ISAS®D4C. Además de las diferencias de construcción y concepto, se pueden observar los diferentes métodos de carga.

Figura 2 Zonas de recuento en cada cámara: A) Spermtrack®. B) ISAS®D4C.

Una vez obtenidas, las muestras se mantuvieron a una temperatura constante de 37 °C, pudiéndose analizar de forma inmediata gracias al uso de licuefactantes en el bote de recogida, ya que el protocolo de trabajo era considerablemente complejo y se deseaba minimizar el efecto del paso del tiempo entre la recogida y el análisis.

Cámaras de recuento utilizadas

Se utilizaron 2 tipos de cámaras, unas reusables y basadas en el principio de desplazamiento de la gota, las Spermtrack® (fig. 1A), y otras desechables, basadas en el principio de difusión capilar, las ISAS®D4C (ambas cámaras, de Proiser R+D, S.L., Paterna, Valencia, España) (fig. 1B). Además, se evaluó el efecto de la altura de la cámara, utilizando 10 y 20 µm para la Spermtrack® y 10,16 y 20 µm para la ISAS®D4C.

En las cámaras Spermtrack®, se contaron 9 campos (fig. 2A), mientras que en la ISAS®D4C se procedió a contar en el centro de cada uno de sus 7 recuadros (fig. 2B).

Análisis computarizado de las muestras

Todos los análisis se hicieron con un sistema CASA, el ISAS®v1 (Proiser R+D, S.L., Paterna, Valencia, España). Dicho equipo consistió en un microscopio UOP-ISAS, dotado con iluminación led, equivalente a 50W, y óptica de con-

traste de fase negativo de 10x. La cámara utilizada fue una Proiser 782C, a una frecuencia de captura de 25 imágenes por segundo, analizando un segundo en cada caso. El resto del *set-up* considerado fue el que viene indicado por defecto para el análisis de muestras humanas. Tanto las imágenes como los datos se guardaron para su posterior reevaluación.

Se aleatorizó el orden en que se hicieron los análisis para evitar que influyera de forma constante en los resultados obtenidos.

Diseño experimental

Efecto del tiempo de colocación del cobre en las Spermtrack®

En cámaras que siguen el principio de carga por desplazamiento de la gota, como la Makler®, se detectó que el tiempo de colocación del cobre influye en los resultados⁴. Por ello, procedimos a colocar dicho cobre inmediatamente tras la deposición de la gota (tiempo 0) y a los 5, 10 y 15 segundos.

Efecto de la zona de recuento

Este experimento se realizó a tiempo de análisis 0 para todas las cámaras, y también a tiempo de carga 0 para las Spermtrack®.

Puesto que las cámaras Spermtrack® presentan un diseño circular y que la expansión de la gota como consecuencia de la presión ejercida por el cubre debe distribuirse de forma radial, las 8 posiciones periféricas deberían presentar unos valores semejantes, pudiendo ser diferente tan solo en la posición 5.

En el caso de las cámaras ISAS®D4C, el llenado de las mismas se realiza por capilaridad, por lo que podrían darse diferentes distribuciones celulares en función del avance capilar de la muestra. En este caso, las posibles diferencias deberían aparecer a lo largo del recorrido, analizando las posibles modificaciones desde la posición 1 a la 7.

Efecto de la altura y del tipo de cámara

Hasta la fecha, las cámaras basadas en el desplazamiento de la gota por presión han venido siendo de 10 µm, si bien la Organización Mundial de la Salud¹ recomienda usar cámaras de 20 µm. Por su parte, las cámaras desechables presentan mayor diversidad de alturas disponibles.

Como es lógico, la altura del espacio en que se mueven los espermatozoides condiciona la movilidad y la distribución de los mismos, por lo que se analiza el efecto de dicha característica sobre los resultados obtenidos.

Efecto del tiempo de análisis

En este experimento, se analizó el efecto del tiempo transcurrido entre la carga de las cámaras y el análisis de las mismas. Con ello, se pretendía analizar la fiabilidad de las medidas con independencia de cuándo se analizan, así como descartar la toxicidad de la cámara en sí misma si los resultados se mantenían en el tiempo. Las muestras se evaluaron inmediatamente tras la carga de las cámaras (tiempo 0), a los 60, 150 y 300 segundos.

Análisis estadístico

En los diferentes estudios, se procedió a realizar un análisis de varianza de una sola vía, según el experimento conside-

rado. En los casos pertinentes, se aplicó un test de Tukey para el análisis a posteriori de las variaciones entre grupos de estudio. En las comparaciones entre los distintos tipos de cámaras, se consideraron tan solo los 5 donantes coincidentes entre Spermtrack® e ISAS®D4C.

Resultados

Como resultado general, en todos los experimentos cabe constatar que no se observaron diferencias significativas en los valores cinéticos en ninguno de los experimentos considerados.

Efecto del tiempo de colocación del cubre en las Spermtrack®

La primera observación interesante es que los resultados de concentración obtenidos a tiempo 0 con la cámara de 10 µm presentaron una menor dispersión de datos en todos los pacientes. No obstante, el incremento en la variabilidad de los resultados entre los 9 campos analizados fue superior en unos pacientes que en otros. Este resultado no se observó con la cámara de 20 µm, donde la dispersión fue homogénea entre los diferentes tiempos y menor que la observada en las cámaras de 10 µm (fig. 3). En su conjunto, a partir de los 5 segundos, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la concentración en las cámaras de 10 µm, mientras que en las de 20 µm, tan solo se observó significación en el incremento tras 15 segundos (fig. 3). Cabe señalar que en ambos casos, el comportamiento fue diferente con diversos pacientes, de forma que en algunos no hubo modificación ni en una ni en otra cámara, mientras que en otros las hubo en ambos casos.

En cuanto a la medida de la movilidad total, no se observaron cambios en el caso de las cámaras de 10 µm, mientras que en la cámara de 20 µm hubo un incremento signifi-

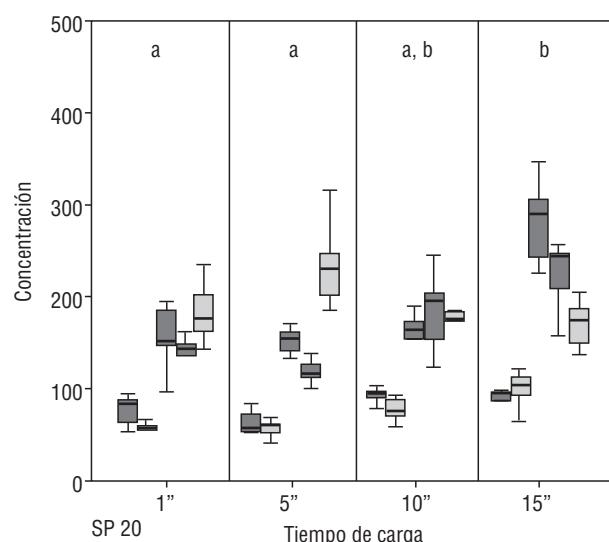
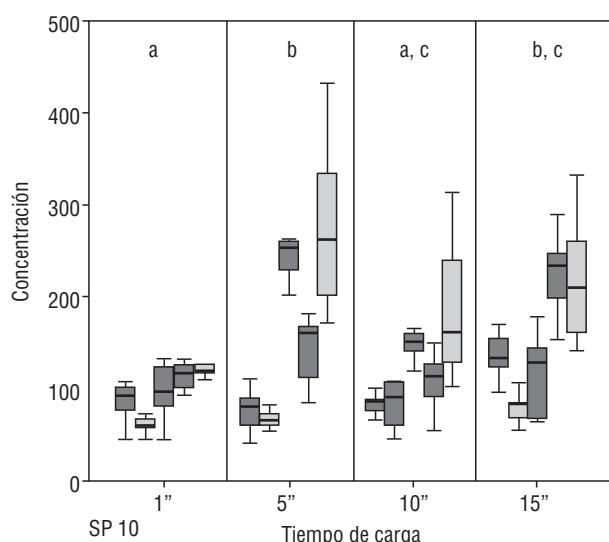


Figura 3 Efecto del tiempo de colocación del cubre sobre los valores de concentración en las cámaras Spermtrack® de 10 y 20 µm. Cada barra representa los valores correspondientes a un donante. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos de carga.

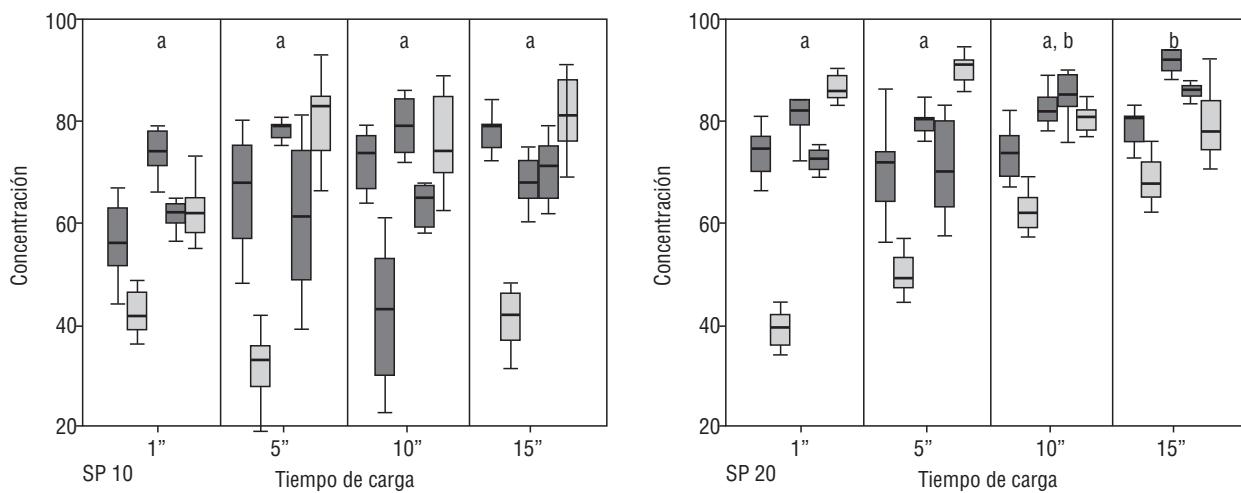


Figura 4 Efecto del tiempo de colocación del cubre sobre los valores de movilidad total en las cámaras Spermtrack® de 10 y 20 μm . Cada barra representa los valores correspondientes a un donante. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tiempos de carga.

cativo tras un tiempo de 10 segundos o más. También en este caso, se vio un comportamiento diferencial en función del paciente (fig. 4).

Efecto de la zona de recuento

Las variaciones observadas en las 2 cámaras Spermtrack® fueron completamente aleatorias, no observándose variaciones entre la posición central y ninguna de las periféricas, indicando que la distribución de células y su movilidad no se ve alterada por dicha variable.

En cuanto a las cámaras ISAS®D4C, se puede observar que hay una constancia considerable en los valores obtenidos en los diferentes puntos de recuento, y que las variaciones observadas son aleatorias, tanto en los valores de concentración como en los de movilidad. Tan solo en 2 de los recuentos (el correspondiente al color azul claro en la cámara de 10 μm y el magenta en el de 20 μm), se observó un valor claramente superior de movilidad total en la zona 1, como consecuencia de la presencia de un movimiento pasivo (*drifting*) (fig. 5).

Efecto de la altura y del tipo de cámara

En las cámaras Spermtrack®, se puso de manifiesto que tanto la movilidad como la concentración mostraron valores significativamente superiores en las de 20 μm . Por su parte, los valores obtenidos con las cámaras ISAS®D4C no mostraron variación alguna, con independencia de la altura considerada.

Los valores obtenidos con la Spermtrack® de 10 μm y las 3 ISAS®D4C no mostraron diferencias significativas, mientras que sí se observaron respecto de la Spermtrack® de 20 μm (fig. 6).

Efecto del tiempo de análisis

En ninguna de las 2 cámaras (Spermtrack® e ISAS®D4C) ni para ninguna de las alturas consideradas, se observaron

cambios significativos en la concentración ni la movilidad total durante todo el tiempo en que se analizaron las muestras.

Discusión

La determinación precisa de la concentración y la movilidad espermática resulta imprescindible para la correcta valoración de la calidad seminal. En concreto, la concentración se puede determinar por diversos métodos que incluyen la atenuación de un haz óptico de dispersión o absorción de la luz (fotómetro), el recuento individualizado de las células en un aparato de restricción de flujo (Coulter counter, citómetro de flujo) o a partir de los sistemas clásicos del hemocitómetro usando cámaras, sean desechables o reusables².

A su vez, los recuentos hechos con el uso de cámaras de recuento pueden valorarse de forma manual o con el uso de sistemas CASA⁴. En todo caso, la literatura científica no ha desarrollado adecuadamente la valoración de los diferentes tipos de cámara que se pueden utilizar. Además, hay que tener en cuenta que sea cual sea el método utilizado para determinar la concentración espermática, siempre se parte de tomar una porción de la muestra total, por lo que nunca se podrá hacer más que una estimación de la concentración real⁵.

Cuando se introduce un nuevo equipamiento, mucha gente pasa a usarlo solo porque es nuevo, mientras que otra lo rechaza apelando a la tradición⁶. Ambas posturas son igualmente erróneas, requiriéndose la realización de estudios pormenorizados de su uso y limitaciones. Así, cuando abordamos la realización de este estudio preliminar, lo hicimos desde la perspectiva de la valoración en profundidad del porqué de cada método, y de sus posibles limitaciones.

La mayoría de los estudios parten de considerar el uso del hemocitómetro como el *Gold standard*, si bien su uso presenta limitaciones considerables, como la necesidad de diluir la muestra y todo el error técnico que ello comporta⁷. Además, como se indicó en la introducción, para su calibra-

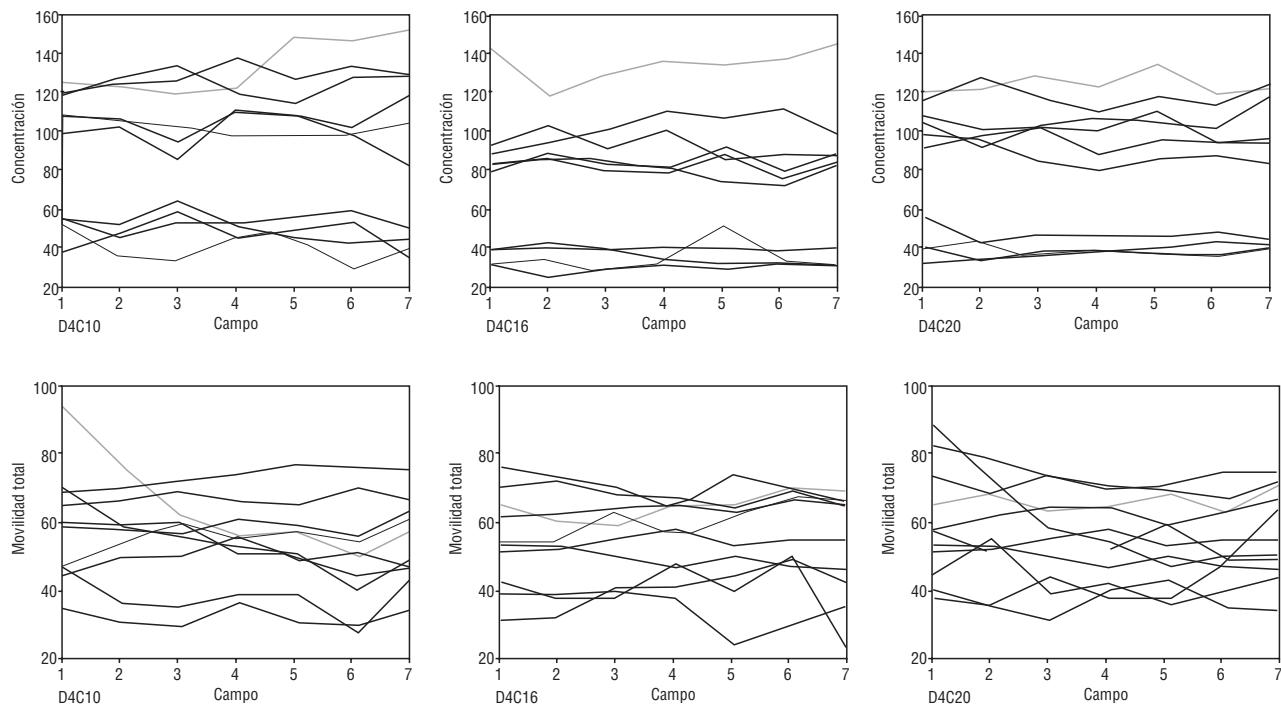


Figura 5 Efecto de la zona de recuento sobre los valores de concentración (fila superior) y de movilidad (fila inferior) en las cámaras ISAS®D4C de 10, 16 y 20 μm . Cada barra representa los valores correspondientes a un donante.

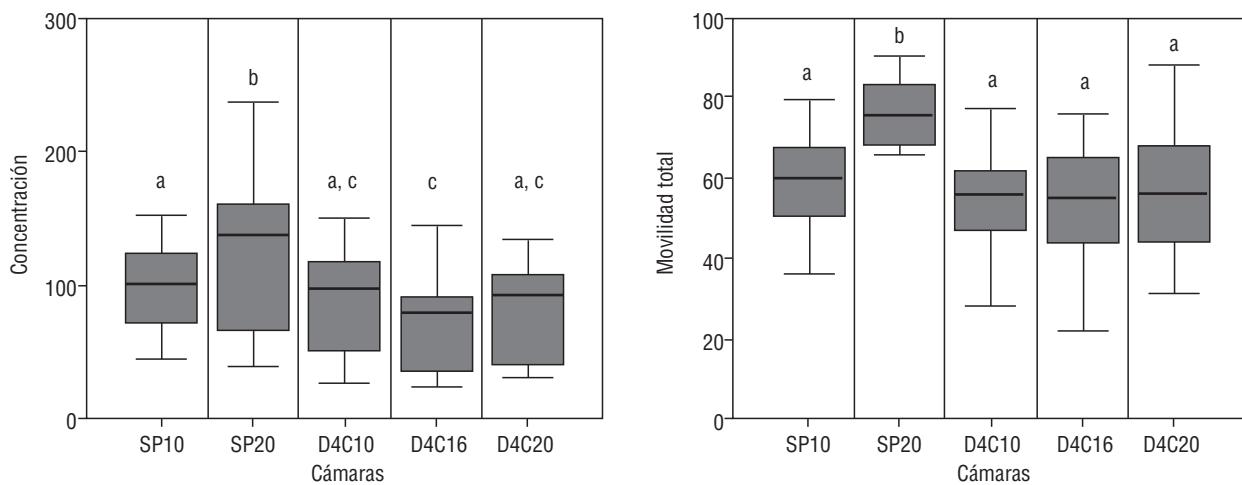


Figura 6 Efecto del tipo de cámara de recuento y la altura de la misma sobre los valores de concentración y de movilidad en las cámaras ISAS®D4C de 10, 16 y 20 μm . Diagramas de caja, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

do se han hecho diversos estudios utilizando bolas de látex³, con las limitaciones que eso supone.

Partiendo de la presunción de que hay un *Gold standard*, diversos estudios han propuesto curvas de regresión entre el mismo y el nuevo instrumento considerado, con el fin de determinar “factores de corrección” que hagan equivalentes los resultados entre ambos^{8,9}. Pero esta aproximación metodológica tan solo tiene sentido a partir de la suposición de que realmente existe ese *Gold standard*. Según nuestro punto de vista, sería más correcto hablar de un *es-*

tablished standard, lo que tiene un significado completamente distinto. Es evidente que cualquier nuevo criterio de medida debe compararse con lo preexistente para adaptar los resultados, pero teniendo en cuenta que la calidad de una medida se refiere a su precisión y repetitividad y no al momento histórico en que aparece.

En el presente trabajo, se ha optado por centrarse en la evaluación de dichos parámetros, dejando para más adelante el estudio comparativo con otros sistemas de medida preexistentes.

En líneas generales, tanto las cámaras reusables, que seguían el principio de desplazamiento de la gota, como las desecharables, que seguían el de difusión capilar, se mostraron útiles en la determinación de la concentración y la movilidad espermáticas. No se observaron cambios en la distribución de los valores en función de la zona de recuento o del tiempo transcurrido entre la carga y el análisis. Ello indica que hay una ausencia de toxicidad, y que el diseño de las cámaras es uniforme, no viéndose alterados los resultados por el mismo, como sí ocurría con otros tipos de cámaras preeexistentes.

En particular, cabe señalar que no se ha observado el llamado efecto Makler®, consistente en la aparición de un incremento en la concentración, no solo de espermatozoides, sino incluso de bolas de látex. Este hecho hizo pensar que el efecto de incremento de la concentración en función del tiempo transcurrido entre la deposición de la gota y la colocación del cubre era debido a la distribución física de las partículas y no a un efecto biológico¹⁰.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que este efecto no se produce en la Spermtrack®, posiblemente debido a la diferente composición del material utilizado, ya que el principio físico en que se sustenta es el mismo. No obstante, se observó una marcada diferencia en la dispersión de resultados al usar las cámaras Spermtrack® de 10 µm con el incremento en el tiempo de carga en unos pacientes y no en otros. Este hecho podría indicar la presencia de un efecto biológico, ya que en el volumen de la gota puede producirse una especie de *swim-up*, de forma que al tardar más tiempo en desplazarla podría haber un incremento de células móviles en la zona central de la misma. Llama la atención que con las cámaras de 20 µm este efecto no haya sido tan evidente.

La Organización Mundial de la Salud¹ recomienda el uso de cámaras de 20 µm; al respecto, es interesante señalar que los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las diferentes alturas evaluadas en las cámaras desecharables, mientras que sí se manifestaron en las reusables. Ello hace pensar que el efecto debido al sistema de carga de las cámaras (desplazamiento o capilaridad) debe ser adecuadamente evaluado a la hora de decidir qué cámara utilizar y por qué hacerlo.

Conclusión

Este estudio preliminar permite afirmar que el uso de estos 2 nuevos tipos de cámaras presenta un nivel de precisión y repetitividad satisfactorio, incluso superior al que se observa en otras cámaras previamente utilizadas. No obstante, es necesario completar los presentes trabajos para llegar a conclusiones firmes, que incluyan comparaciones con otros sistemas, definiendo factores de corrección entre ellas que permitan comparar adecuadamente los resultados.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflictos de intereses

María Sancho y Almudena García pertenecen a la plantilla de la compañía fabricante de las cámaras analizadas (Projectes i Serveis, R+D, S.L., Paterna, Valencia, España).

Projectes i Serveis, R+D, S.L. proporciona asesoría técnica a la Universitat de València.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a la compañía PROiSER R+D haber proporcionado todo el material necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Bibliografía

- Organización Mundial de la salud. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5.^a ed. Cambridge: University Press; 2010.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Alt-house GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. J Androl. 2005;26:107-14.
- Shiran E, Stoller J, Blumenfeld Z, Feigin PD, Makler A. Evaluating the accuracy of different sperm counting chambers by performing strict counts of photographed beads. J Assist Reprod Genet. 1995;12:434-42.
- Matson P, Irving J, Zuvela E, Hughes R. Delay in the application of the cover glass is a potential source of error with the Makler Counting Chamber. Fertil Steril. 1999;72:559-61.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Alt-house GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. J Androl. 2005;26: 115-22.
- Coetzee K, Menkveld R. Validation of a new disposable counting chamber. Arch Androl. 2001;47:153-6.
- Riddell D, Pacey A, Whittington K. Lack of compliance by UK andrology laboratories with World Health Organization recommendations for sperm morphology assessment. Hum Reprod. 2005;20:3441-5.
- Lu JC, Chen F, Xu HR, Huang YF, Lu NQ. Comparison of three sperm-counting methods determination of sperm concentration in human semen and sperm suspensions. Labmedicine. 2007;38:232-6.
- Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Büeker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. Theriogenology. 2005;63:992-1003.
- Hansen C, Vermeiden T, Vermeiden JP, Simmet C, Day BC, Feitsma H. Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, Ulti-Mate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. Theriogenology. 2006;66:2188-94.