

Comparación entre Testsimplets® y Diff-Quik para la evaluación de la morfología espermática

Drs. Karina Nieto-Dionisio*, María Teresa Urbina*, Randolpho Medina*, Isaac Benjamín*, René Utrera**, Jorge Lerner Biber*

Unidad de Fertilidad UNIFERTES. Caracas,

RESUMEN

Objetivo: Comparar la evaluación de morfología espermática mediante dos tinciones: Testsimplets® y Diff-Quik y la eficiencia de Testsimplets® y el test de peroxidasa para evaluar leucocitos en semen.

Métodos: Comparamos la morfología espermática de las muestras seminales de 30 pacientes infértiles, evaluada a través de las tinciones Testsimplets® y Diff-Quik. Adicionalmente, en pacientes que presentaron más de 10⁶ de células redondas por mL de semen (n=7), comparamos la evaluación de leucocitos por Testsimplets® y el test de peroxidasa.

Ambiente: Centro de fertilidad UNIFERTES, en Caracas, Venezuela.

Resultados: No existen diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, siguiendo el criterio estricto de Kruger, entre ambas tinciones. Encontramos diferencias significativas en los porcentajes de los siguientes defectos morfológicos espermáticos, entre tinción: cabeza piriforme, pieza media doblada, irregular o con gota citoplasmática. No se encontraron diferencias significativas en la evaluación de leucocitos en semen mediante Testsimplets® y el test de peroxidasa.

Conclusiones: Testsimplets® es práctico para ahorrar tiempo y, consecuentemente, mejorar la eficiencia en el tiempo de entrega de resultados. Sin embargo, es considerablemente más costoso que Diff-Quik.

Palabras clave: Testsimplets®. Diff-Quik. Morfología espermática. Criterio estricto de Kruger. Test de peroxidasa. Leucocitospermia.

SUMMARY

Objective: To compare sperm morphology by Testsimplets® and Diff-Quik staining. To compare the efficiency of Staining cellular peroxidase and Testsimplets® to assess leukocytes in semen.

Methods: We compared sperm morphology of 30 infertile patients evaluated by Testsimplets® and Diff-Quik staining. Additionally, in patients with more than 10⁶ round cells per ml semen (n=7), we compared the assessment of leukocytes by Staining cellular peroxidase and Testsimplets®.

Setting: Fertility clinic UNIFERTES, in Caracas, Venezuela.

Results: There was no significant difference in the percentage of morphologically normal sperm, according to Kruger's strict criteria, between both stains. We found significant differences in the percentages of the following sperm morphological defects between staining: pyriform head, folded middle piece, irregular and presence of cytoplasmic droplets. There was no significant difference in the assessment of leukocytes in semen by Staining cellular peroxidase and Testsimplets®.

Conclusions: Testsimplets® is practical for saving time and consequently, improving the efficiency in the delivery time of results. Nonetheless, it is considerably more expensive than Diff-Quik.

Key words: Testsimplets®. Diff-Quik. Sperm morphology. Kruger strict criteria. Peroxidase Test. Leukocytospermia.

* Unidad de Fertilidad UNIFERTES. Caracas, Venezuela; ** Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Trabajo presentado en el II Congreso de AVEMERE, Caracas, Venezuela. Trabajo presentado por Licenciada Karina Nieto-Dionisio para optar por el título de Licenciada en Biología de la Universidad Simón Bolívar.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud reconoce que la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo y la define como la imposibilidad de una pareja de lograr un embarazo después de un año

de vida sexual activa, sin utilizar anticonceptivos (1). Actualmente, el 15 %-20 % de las parejas en edad reproductiva son infértiles (2). Alrededor del 50 % de estas parejas serán diagnosticadas con un factor masculino, el otro 50 % presentará un factor femenino, y 10 % del total presentará factores mixtos.

El examen que brinda la visión más amplia de la capacidad reproductiva del hombre, y el que hasta ahora sigue siendo la forma de detectar el factor masculino, es el espermograma, que incluye el estudio de la concentración, movilidad y morfología espermáticas. La pobre calidad seminal está representada entonces por parámetros anormales, como concentración espermática baja, movilidad espermática baja y morfología espermática (ME) anormal. El porcentaje de espermatozoides con ME anormal ha sido asociado con las tasas de fecundación, clivaje embrionario, implantación e infertilidad en humanos (3-6). Otros estudios proponen además que esta relación puede verse afectada por otras variables, como la concentración espermática o los riesgos de las técnicas utilizadas (7-9).

Existen diversos métodos para evaluar la ME en una muestra seminal: desde fijar sobre un portaobjetos la muestra seminal, teñirla y evaluarla a un aumento de 1 000x, hasta la evaluación a alto aumento (hasta 6 000x) de los espermatozoides sin teñir. Dos de las tinciones más utilizadas son la de Testsimplets® y la de Diff-Quik. Sin embargo, según una encuesta realizada por Ombelet y col. (10) de 170 personas que respondieron en el mundo: 33,5 % usa tinción Papanicolaou, 22,9 % usa tinción Diff-Quik, 4,7 % usa tinción Shorr y solo 6,5 % usa Testsimplets®.

Además del poco uso de Testsimplets® en el mundo, existe muy poca información publicada disponible acerca de este test y son trabajos que se realizaron comparando este test con otras tinciones, o siguiendo otros sistema de clasificación de ME diferentes al criterio estricto de Kruger, mucho antes de que este fuera publicado y de que fuera aceptado por la OMS. Los estudios publicados son: Schirren y col. (11), que compararon el estudio de la ME entre Testsimplets® y Papanicolaou; Calamera y Vilar (12), compararon los resultados obtenidos al analizar la ME entre Testsimplets® y las tinciones de Pappenheim y de Couture; Schoenfeld y col. (13), que compararon los resultados de ME obtenidos al teñir las muestras con hematoxilina-eosina y utilizando Testsimplets®, y Henkel y col. (14) que compararon Testsimplets® y otras tinciones, como Papanicolaou y Shorr. La carencia de información acerca de Testsimplets® hace necesaria la comparación con otras técnicas de

tinción reconocidas como Papanicolaou y Diff-Quik. La tinción de Diff-Quik fue introducida por Kruger y col. en 1987 (15) y es la utilizada en UNIFERTES. Diff-Quik es una tinción rápida si se compara con Papanicolaou. En varios trabajos se reportó que Diff-Quik era un método confiable, especialmente para análisis computarizados porque al parecer las computadoras reconocen mejor las anomalías espermáticas cuando se trabaja con esta tinción (16-19). Sin embargo, otros autores encontraron que había un mayor porcentaje de formas normales con Diff-Quik (20-22).

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es comparar los resultados de la evaluación de ME mediante dos tinciones: Testsimplets® y Diff-Quik. Adicionalmente, se comparará la evaluación de los leucocitos en el semen mediante Testsimplets® y el Test de peroxidasa.

MÉTODOS

Es un estudio comparativo y prospectivo. Se analizó la ME de las muestras seminales de 30 pacientes de UNIFERTES, con Testsimplets® y Diff-Quik, que presentaban una concentración espermática mayor a 20 millones/mL, y una movilidad espermática mayor a 50 % de espermatozoides progresivos rápidos y moderados. Para realizar la tinción de Diff-Quik, se efectuó un frotis en un portaobjeto con 60 µL de la muestra seminal, y se teñió siguiendo los pasos descritos para esta tinción (23). Para realizar la tinción de Testsimplets®, se tomó 10 µL de la muestra seminal, se colocó en la mitad del portaobjeto preteñido, y se cubrió con un cubreobjetos. Se dejó transcurrir 15 minutos para que los espermatozoides perdieran movilidad y la tinción hiciera efecto. En ambos casos, se evaluaron 100 espermatozoides a un aumento de 1 000x. Se contaron los espermatozoides normales y los anormales siguiendo el criterio estricto de Kruger. Se clasificaron los espermatozoides anormales de acuerdo con el defecto morfológico observado, de la siguiente manera:

En cabeza: si era alargada, piriforme, si presentaba doble cabeza, si era redonda, si era grande (macrocéfala), si era pequeña (microcéfala), o si era amorfa.

En pieza media: si en la unión pieza media-cabeza, la primera estaba doblada; si era gruesa, si era irregular, o si presentaba gotas citoplasmáticas.

En flagelo: si se encontraba enrollado, si era doble, si era corto, si respecto a la unión con la cabeza era abaxial y si estaba doblado.

Se compararon los resultados de cabezas piriformes y alargadas, entre ambas tinciones, ya que algunos autores explican que los espermatozoides podrían permanecer de lado debido al soporte húmedo de la lámina de Testsimplets®, que no implica un proceso de fijación, llevando a confundir al observador inexperto con el defecto de cabeza alargada o piriforme (13,14). Además, se deseó saber si Testsimplets® podía ser utilizado para evaluar el porcentaje de células redondas en semen, en vez de con el test de peroxidasa (23). En aquellos pacientes (n = 7) que en la observación inicial presentaban un número de células redondas mayor a 10⁶ por mL de semen, se realizó el test de peroxidasa, contando el porcentaje de células redondas de la línea blanca y de la línea espermática. También se contaron células redondas de ambos tipos en la lámina de Testsimplets®. Posteriormente, con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies), se compararon los resultados obtenidos tanto en la evaluación morfológica como en el conteo de células redondas, siguiendo una prueba-t pareada.

RESULTADOS

En la Figura 1 se puede observar que no existen diferencias entre datos, de los cuales se compararon sus medias con una prueba-t pareada y se construyó el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde -1,87047 hasta 1,93714. Puesto que el intervalo contiene el valor de 0, no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, con un nivel de confianza del 95,0 %. Además, como el valor P calculado no es menor que 0,05, no se puede rechazar la hipótesis nula (que ambas medias son iguales).

Se compara el porcentaje promedio de espermatozoides con defectos de cabeza alargada y piriforme en la Figura 2, ya que el aumento de estos defectos en Testsimplets® podría estar asociado al

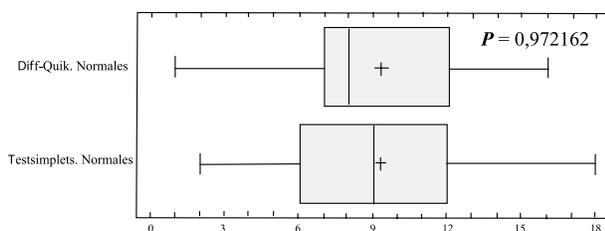


Figura 1. Gráfico de caja y bigote de porcentaje de espermatozoides normales contados con Diff-Quik y Testsimplets®.

uso del mismo. Se puede observar que, aunque no se rechaza la hipótesis nula al comparar cabezas alargadas, sí se rechaza en cabezas piriformes.

Se compararon los promedios de defectos morfológicos observados que presentaban diferencias significativas entre tinciones y se presentan en la Figura 3. Se obtuvo que los siguientes defectos morfológicos diferían entre ambas tinciones: además de cabeza piriforme, pieza media doblada o irregular y presencia de gotas citoplasmáticas.

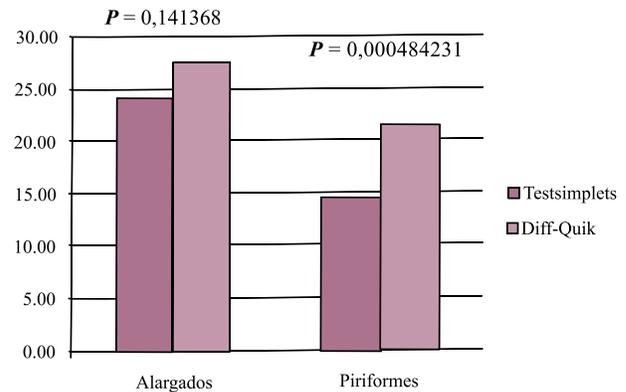


Figura 2. Porcentaje promedio de espermatozoides con defectos de cabeza alargada y piriforme, según la tinción utilizada.

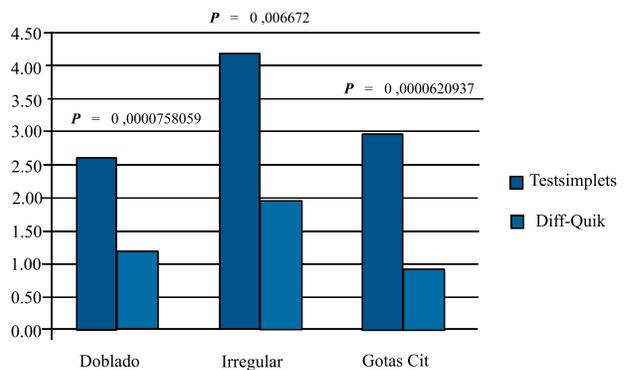


Figura 3. Promedios de defectos morfológicos observados que presentaban diferencias significativas entre tinciones.

Finalmente, en el Cuadro 1 se puede observar que en la comparación entre Testsimplets® y el test de peroxidasa, el valor P calculado no es menor que 0,05, por tanto no se rechaza la hipótesis nula. Es decir, no hay diferencias significativas entre el conteo de células redondas entre Testsimplets® y el test de peroxidasa.

Cuadro 1

Prueba-t pareada para comparar las medias del número de células redondas de las líneas blanca y espermática, evaluadas tanto con Testsimplets® como con el test de peroxidasa

Comparación de Medias LB y LE

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 ≠ media2

suponiendo varianzas iguales:

t= 0,183232 valor P = 0,857675

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

DISCUSIÓN

No existen diferencias significativas en el análisis de ME normal entre ambas tinciones, lo cual concuerda con los resultados de algunos autores como Schirren y col. (11), Calamera y Vilar (12), quienes no encontraron diferencias significativas en sus análisis, y que además concluyeron que Testsimplets® es una tinción rápida y confiable, pero que no puede ser preservada, y Schoenfeld y col. (13), quienes resaltaron que, aunque las instrucciones de Testsimplets® recomienda esperar 2 horas para que los espermatozoides se inmovilicen, ellos observaron que al cabo de 4 minutos ya todas las células se encontraban inmovilizadas y teñidas (11-13). Mientras otros autores como Henkel y col. (14), que compararon la ME según Kruger con Papanicolaou y Shorr, sí observaron diferencias significativas entre Testsimplets® y las otras tinciones. También describen la imposibilidad de guardar las muestras en las láminas de Testsimplets® para futuras observaciones (14).

Para subsanar este problema, la empresa productora de Testsimplets® recomienda una técnica con formalina 10 % que permite preservar las láminas de Testsimplets® hasta por 4 meses. Schoenfeld y col. (13) observaron que si se cubría la lámina de Testsimplets® con un cubreobjeto y luego se recubría con pintura de uñas, la muestra podía ser observada hasta 5 días después. Si además, luego de la evaluación, se le removía el cubreobjetos y se dejaba secar la muestra al aire, la tinción podía durar hasta 3 meses. Si se removía el cubreobjetos, la muestra se dejaba secar al aire y se fijaba con formalina al 10 %, la tinción podría durar hasta 3 meses, de la misma manera como recomienda Testsimplets® (13).

Durante la evaluación de la ME con Testsimplets®, se hicieron algunas observaciones. Una de ellas era que algunos de los espermatozoides observados

parecían estar de lado debido a la forma que presentaba la cabeza, lo cual concuerda con las observaciones realizadas por Henkel y col. (14). Schoenfeld y col. (13) y otros autores (14) explican que los espermatozoides podrían permanecer de lado debido al soporte húmedo de la lámina de Testsimplets®, que no implica un proceso de fijación, llevando a confundir al observador inexperto con el defecto de cabeza alargada o el defecto de cabeza piriforme; sin embargo, en este trabajo no se obtuvieron diferencias entre el defecto de cabeza alargada entre tinciones, pero sí se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides con cabezas piriformes en la evaluación con Diff-Quik que con Testsimplets®. También explican que, por este mismo soporte húmedo, los espermatozoides podrían hincharse, modificando también las observaciones realizadas. Henkel y col. (14) no recomiendan el uso de Testsimplets®, aunque lo hayan encontrado correlacionado con Papanicolaou.

De entre todos los defectos morfológicos evaluados (de cabeza, pieza media y cola), solo cuatro presentaban, al comparar las medias de cada tinción, diferencias estadísticas (cabeza piriforme, pieza media doblada, con borde irregular y con presencia de gotas citoplasmáticas). Según lo observado por Henkel y col. (14), cabe resaltar el hecho que se esperaba mayor porcentaje de cabezas piriformes en la evaluación por Testsimplets® que en la evaluación por Diff-Quik. Mortimer y Mortimer (24) comentan que una cabeza piriforme, en la cual la base de la cabeza no es redondeada sino puntiaguda, indica una debilidad de la región entre cabeza y pieza media.

Respecto a las cabezas piriformes, Rousso y col. (25) realizaron un estudio para investigar la frecuencia de espermatozoides con cabeza piriforme, el porcentaje de ocurrencia de este defecto morfológico, y para evaluar la posible correlación de este defecto con otros parámetros seminales. Los espermatozoides con cabeza piriforme fueron observados en 98,2 % de las muestras seminales; en hombres subfértiles, el defecto se presentaba en 22 % del total de espermatozoides contabilizados; y observaron una correlación positiva entre este defecto y otros, como la pieza media doblada, la presencia de gotas citoplasmáticas y el flagelo enrollado. Los autores afirman que “a mayor número de espermatozoides con la cabeza piriforme, mayor el porcentaje de formas espermáticas anormales y mayor el número de anomalías morfológicas por espermatozoide” (25). Las imágenes de las células de la muestra seminal se ven en tres dimensiones (3D), debido posiblemente al soporte húmedo de la lámina. En el frotis y tinción con Diff-Quik, las imágenes se

observan en dos dimensiones (2D), es decir, el enfoque de la imagen de la célula se encuentra en un solo plano al observarla a través del microscopio, mientras que con Testsimplets® se debe mover el micrómetro del microscopio para observar en varios planos todas las partes de la célula analizada; quizás este hecho podría permitir en Testsimplets® observar mejor las anomalías de flagelo y pieza media, y podría explicar las diferencias obtenidas al evaluar los defectos de pieza media. Sin embargo, Mortimer y Menkveld (26), comentaron que Testsimplets® puede dar preparaciones de baja calidad, y que su análisis puede ser más difícil y lento que la tinción de Papanicolaou. Incluso, Diff-Quik tampoco puede proveer de todos los detalles y penetración que Papanicolaou puede ofrecer.

Aunque se analizaron pocos casos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de células redondas entre el test de peroxidasa con Testsimplets®, los resultados sugieren que es confiable utilizar Testsimplets® para el análisis de células redondas en la muestra seminal, en concordancia con el estudio de Henkel y col. (14). En otro estudio realizado por Riedel (27), en el cual compararon el uso de Testsimplets® con la tinción de Papanicolaou para determinar la presencia de células redondas de la línea blanca, se concluyó también que es posible utilizar Testsimplets®. Schoenfeld y col. (13) sugieren que Testsimplets® permite una diferenciación fácil entre células redondas, ya que las células de la línea blanca exhiben claramente sus gránulos individuales. Angelopoulos y col. (28), también analizaron células redondas con Testsimplets® y confirmaron el tipo celular mediante FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), y sugirieron que se puede utilizar Testsimplets® para seleccionar células redondas de la línea espermática para uso investigativo o clínico.

El Test de peroxidasa consiste en mezclar 10 µL de bencidina/*o*-toluidina con 10 µL de peróxido de hidrógeno y 10 µL de la muestra seminal. La bencidina y el *o*-toluidina son potentes carcinogénicos; en humanos se han asociado a un aumento de contraer cáncer en riñones, uretra y vejiga. Una de las ventajas del Testsimplets® es que no contiene bencidina ni *o*-toluidina, aunque las cantidades de estos compuestos a las que se expone el operador durante la realización del Test de peroxidasa son mínimas. La realización de la tinción con Testsimplets® es mucho más rápida que las otras tinciones, ya que Testsimplets® es una tinción del tipo pancromático (todos los colorantes neutros actúan juntos en un solo paso), mientras la

tinción de Diff-Quik es del tipo panóptico (coloración combinada realizada sucesivamente por colorantes neutros). Henkel y col. (14) reportan, además, los altos costos de Testsimplets®. Una investigación realizada por las páginas web de algunas distribuidoras médicas señala que ofrecen este producto a □90 aproximadamente para 100 muestras, mientras que Diff-Quik está por el orden de los □112 o los \$226, para más de 1 000 muestras (29,30).

Es muy importante realizar una buena historia clínica, ya que algunos factores que causan anomalías morfológicas espermáticas pueden ser disminuidos con cambios en el estilo de vida del paciente. Este trabajo comparó la evaluación de la ME siguiendo el criterio estricto de Kruger, mediante las tinciones Testsimplets® y Diff-Quik. Es importante resaltar que ninguno de los trabajos anteriores comparó Testsimplets® con Diff-Quik siguiendo el criterio estricto de Kruger, bien sea porque estos trabajos compararon Testsimplets® con otra tinción, o lo compararon con Diff-Quik pero siguiendo un criterio distinto al de Kruger. Los resultados de este trabajo muestran que se puede utilizar Testsimplets® para el análisis de la ME, y permite ahorrar tiempo y mejorar la eficiencia del laboratorio de andrología en cuanto al tiempo de entrega de resultados, lo cual es importante en la evaluación clínica; pero es mucho más costoso que Diff-Quik. Si la rapidez en la entrega de resultados en la evaluación clínica es importante, se puede usar Testsimplets® mencionándolo en el reporte, ya que los resultados no son diferentes significativamente en este estudio. El método considerado el estándar de oro para la evaluación morfológica por la mayoría de los autores es el criterio estricto de Kruger con la tinción de Papanicolaou y Diff-Quik. Si mantener los altos estándares en el laboratorio es lo importante, este es el método que se debe utilizar, al menos para tomar decisiones en pacientes que tienen resultados morfológicos dudosos o muy cercanos a lo normal (*borderline*). Son necesarios más trabajos para poder establecer el uso de Testsimplets® como una técnica confiable para la evaluación de la ME. Si los métodos producen diferentes perfiles de ME, quizás sea necesario establecer un valor normal para cada método (Testsimplets® y Diff-Quik) que se relacionen con los resultados de la fecundación *in vitro* (FIV).

REFERENCIAS

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. en nombre de ICMART y WHO. The International Committee

COMPARACIÓN ENTRE TESTSIMPLETS® Y DIFF-QUIK

- for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. *Hum Reprod.* 2009;24:2683-2687.
2. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causas de la infertilidad. *Rev Col Obstet Ginec.* 2003;54:227-248.
 3. Branzini C, Fiszbajn G, Nodar F, Maggiotti G, Chemes H, Rawe V. Anomalías en la implantación cabeza-cuello del espermatozoide y sus consecuencias durante el clivaje embrionario. *Reprod.* 2008;23:15-20.
 4. El-Ghobashy A, West C. The human sperm head: A key for successful fertilization. *J Androl.* 2003;24:232-238.
 5. Salumets A, Suikkari A, Möls T, Söderström-Antilla V, Tuuri T. Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development. *Fertil Steril.* 2002;78:1082-1087.
 6. Huang C, Pei-Cheng D, Tsao H, Cheng T, Liu C, Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2005;84:130-140.
 7. French D, Sabanegh E, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril.* 2009;93:1097-1103.
 8. Keegan BR, Barton S, Sanchez X, Berkeley A, Krey L, Grifo J. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for ICSI. *Fertil Steril.* 2007;88:1583-1588.
 9. Miller J, Smith T. The effect of ICSI and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod.* 2001;16:918-924.
 10. Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum Reprod.* 1997;12:1015-1020.
 11. Schirren C, Eckhardt U, Jachczik R, Carstensen CA. Morphological differentiation of human spermatozoa with Testsimplets® slides. *Andrologia.* 1977;8-9.
 12. Calamera JC, Vilar O. Comparative study of sperm morphology with three different staining procedures. *Andrologia.* 1979;11:255-258.
 13. Schoenfeld C, Amelar R, Dubin L, Amelar S. A new staining technique for the rapid determination of the morphologic characteristics of sperm. *Fertil Steril.* 1981;36:408-410.
 14. Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, Hipler UC, Zermann DH, Menkveld R. Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2008;89:449-455.
 15. Kruger TF, Ackerman S, Simmons K, Swanson R, Brugo S, Acosta A. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987;18:275-277.
 16. Barroso G, Mercan R, Ozgur K, Morshedi M, Kolm P, Coetzee K. Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: Impact of semen preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. *Hum Reprod.* 1999;14:2036-2040.
 17. Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R. Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia.* 2001;33:159-163.
 18. Soler C, Gassner P, Nieschlag E, De Monserrat J, Gutiérrez R, Sancho M, et al. Utilización del ISAS (Integrated Semen Analysis System) para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Rev Intern Andrología.* 2005;3:112-119.
 19. Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology.* 2006;66:996-1003.
 20. Menkveld R, Lacquet F, Kruger TF, Lombard C, Sanchez C, Devilliers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerized methods. *Andrologia.* 1997;29:1-7.
 21. Root MV, Olson P, Johnston S, Root TK. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998;34:348-352.
 22. Coetzee K, Kruger T, Vandendael A, Devilliers A, Lombard C. Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations. *Andrologia.* 1997;29:133-135.
 23. Organización Mundial de la Salud (OMS). WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. 5ª edición. Suiza: WHO Press; 2010. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
 24. Mortimer D, Mortimer S. Laboratory investigation of the infertile male. En: Brinsden PR, editor. A textbook of IVF and ART. 2ª edición. UK: The Pathernon Publishing Group Inc., 1999.p.59-61.
 25. Rouso D, Kourtis A, Mavromaditis G, Gkoutzioulis F, Makedos G, Panidis D. Pyryiform head: A frequent but little-studied morphological abnormality of sperm. *Arch Andrology.* 2002;48:267-272.
 26. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment - Historical perspectives and current opinions. *J Androl.* 2001;22:192-205.
 27. Riedel HH. Techniques for the detection of leukocytospermia in human semen. *Syst Biol Reprod Med.* 1980;5:287-293.
 28. Angelopoulos T, Krey L, McCullough A, Adler A, Grifo J. A simple and objective approach to identifying human round spermatids. *Hum Reprod.* 1997;12:2208-2216.
 29. The Infertility Shop. Diff-Quik. 2010. Barcelona: Theinfertilityshop.com; 2010. Disponible en: <http://www.theinfertilityshop.com/>
 30. Quirumed. Testsimplets. 2010. Valencia: Quirumed. com; 2010. Disponible en: <http://www.quirumed.com/es/>