

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

Impacto de factores etiológicos y de técnicas de capacitación sobre la calidad seminal en tratamientos de reproducción asistida

Autor: Jorge Rodríguez-Barbero Tercero

Tutora: María Cruz

Villaviciosa de Odón, Septiembre 2021

ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	3
ÍNDICE DE TABLAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 INFERTILIDAD Y CITOLOGÍA MASCULINA.....	6
1.2 SEMINOGRAMA	7
1.3 FACTOR MASCULINO Y PATOLOGÍAS (CAUSAS Y TRATAMIENTOS).....	9
1.3.1 Alteraciones en el número de espermatozoides	9
1.3.2 Alteración en la movilidad de espermatozoides.....	11
1.3.3 Alteración en la morfología de espermatozoides.....	12
1.3.4 Alteración en el volumen del eyaculado	12
1.3.5 Alteración en la vitalidad de los espermatozoides.....	12
1.3.6 Combinación de varias alteraciones.....	12
1.4 TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	13
1.5 TÉCNICAS DE CAPACITACIÓN	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	16
3.2 COMPARACIÓN DE MEDIAS	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVOS	17
4.2 COMPARACIÓN DE MEDIAS	24
5. CONCLUSIÓN	29
6. AGRADECIMIENTOS.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Cámara de Makler	7
Ilustración 2. Cámara de Neubauer	7
Ilustración 3. Vista real Cámara de Makler	8
Ilustración 4. Diferentes tipos de alteraciones en la concentración del semen	11
Ilustración 5. Tipos de movilidad de espermatozoides.....	11
Ilustración 6. Comparación de una muestra de morfología normal frente a una muestra teratozoospermica	12
Ilustración 7. Técnica de swim-up.....	14
Ilustración 8. Técnica de capacitación por gradientes de densidad	15

Índice de tablas

Tabla 1. Frecuencia de cada técnica de capacitación	18
Tabla 2. Frecuencia de técnicas de capacitación agrupadas según el estado del semen	18
Tabla 3. Frecuencias de los rangos de edad.....	19
Tabla 4. Frecuencias cruzadas entre el origen y el estado de los espermatozoides.....	19
Tabla 5. Uso de pentoxifilina.....	19
Tabla 6. Procedencia del semen.....	20
Tabla 7. Frecuencia del uso de pentoxifilina según la procedencia del semen	20
Tabla 8. Frecuencias de etiologías agrupadas por rangos de edad.	21
Tabla 9. Media del número total de espermatozoides móviles progresivos antes y después del capacitado	22
Tabla 10. Medias de la concentración en fresco y tras capacitado agrupadas según la procedencia del semen	23
Tabla 11. Medias de la concentración según el estado del semen antes y después del capacitado.	23
Tabla 12. Medias del número total de espermatozoides móviles progresivos en fresco agrupados por edad	24
Tabla 13. Comparativa de las medias del total de espermatozoides progresivos móviles según la técnica de capacitación	24
Tabla 14. Comparativa de medias de la concentración entre los estados del semen	25
Tabla 15. Comparativa de medias de concentración en fresco según la procedencia del semen	25
Tabla 16. Comparativa de medias del número espermatozoides móviles progresivos en fresco según la edad	25
Tabla 17. Medias de capacitación tras el capacitado agrupaos por capacitación y estado del semen.....	26
Tabla 18. Medias del total del total de espermatozoides móviles progresivos agrupadas según la etiología y la técnica de capacitación.....	27

Resumen

La infertilidad es la incapacidad de una pareja para poder quedarse embarazada y afecta al 10% de la población global. Esto puede deberse a múltiples problemas, tanto para la mujer como para el hombre. La esterilidad masculina puede ser debido a varios factores, que van desde un estilo de vida poco saludable hasta factores genéticos, causando una ausencia parcial o total de espermatozoides, o disminuyendo la calidad de estos.

Debido a esto, las parejas con problemas de fertilidad recurren a clínicas de reproducción asistida, donde se hacen estudios de esterilidad para descubrir donde está el problema. El estudio de esterilidad masculino viene dado por un seminograma, donde se analiza en general la calidad del semen a nivel macro y microscópico. Tras un diagnóstico, se elige que TRA se va a seguir y sus necesarias pruebas. Mediante la capacitación espermática en el laboratorio de andrología, se prepara el semen para su uso en el tratamiento, ya sea FIV, ICSI o inseminación artificial.

Con una base de datos de seminogramas realizados a pacientes y mediante un programa estadístico, se pretende analizar cómo afecta la etiología del paciente, así como la técnica de capacitación, a la calidad final del semen antes de usarlo para un tratamiento de reproducción asistida.

Palabras clave: esterilidad, etiología, capacitación, calidad seminal

Abstract

Infertility is the inability of a couple to get pregnant and affects 10% of the global population. This can be due to multiple problems, both for women and men. Male sterility can be due to several factors, ranging from an unhealthy lifestyle to genetic factors, causing a partial or total absence of sperm, or decreasing sperm quality.

Because of this, couples with fertility problems turn to assisted reproduction clinics, where sterility studies are done to find out where the problem is. The male sterility study is given by a seminogram, where the quality of semen at macro and microscopic levels is analyzed. After a diagnosis, it is chosen which ART is to be followed and its necessary tests. Through sperm capacitation in the andrology laboratory, semen is prepared for use in treatment, either IVF, ICSI or artificial insemination.

With a database of seminograms performed on patients and through a statistical program, it is intended to analyze how the etiology of the patient, as well as the capacitation technique, affects the final quality of semen before using it for an assisted reproduction treatment.

Keywords: sterility, etiology, capacitation, semen quality

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad y citología masculina

La infertilidad es la incapacidad de conseguir un embarazo de manera espontánea en parejas que son sexualmente activas sin el uso de métodos anticonceptivos durante al menos un año. Dentro de los trastornos de fertilidad, podemos diferenciar dos tipos: la infertilidad primaria, que ocurre cuando la pareja nunca ha conseguido un embarazo, y la infertilidad secundaria, que en este caso la pareja ha podido quedarse embarazada una vez, pero no han conseguido el segundo embarazo (1). Se estima que la infertilidad afecta alrededor del 10% de las parejas que están en edad reproductiva a nivel global.

La esterilidad femenina supone alrededor del 30% de los casos totales, y las causas pueden ser ovulatorias, uterinas, tubáricas o cervicales. En cuanto a la esterilidad masculina, supone otro 30% del total de casos y las causas suelen ser las alteraciones tanto en motilidad como en concentración del semen, aunque también puede deberse a disfunción sexual, o a una azoospermia tanto secretora como obstructiva.

Las causas masculinas y femeninas de esterilidad aparecen de manera conjunta en un 25% del total, mientras que el 15% restante es una esterilidad cuyo origen es desconocido. Además de estas causas, también podemos asociar la edad o el consumo de tabaco a factores que promueven la esterilidad. La nutrición (el ejercicio físico y la obesidad), estrés, consumo de alcohol o cafeína, y en general el estilo de vida, son parámetros que hay que valorar y que en conjunto juegan un papel importante en las causas de esterilidad tanto masculina como femenina.

Los estudios de esterilidad se suelen realizar tras un año de relaciones sexuales con el objetivo de quedarse embarazados en el que no ha habido éxito. Es muy importante empezar el estudio con una anamnesis completa (es un proceso para recopilar información realizado mediante preguntas al paciente para conocer su estado de salud actual y sus antecedentes médicos, tanto personales como familiares). Es necesaria una historia clínica detallada (antecedentes médicos, hábitos de consumo, toma de fármacos, alergias), conocer su hábito sexual, y si es necesario, una exploración fenotípica y urológica (1). Sin embargo, la técnica de estudio que más información nos facilita es el seminograma, realizado en una primera visita al centro de reproducción asistida.

1.2 Seminograma

El seminograma, es una prueba sencilla de análisis del semen mediante la cual se obtiene información como el pH, el volumen del eyaculado (teniendo en cuenta los días de abstinencia), el aspecto (color, turbidez) o el homogenizado (2). Además, también se procede a un análisis microscópico donde, mediante una cámara de Makler (Ilustración 1. Cámara de Makler), es muy sencillo observar la concentración, y la movilidad de los espermatozoides (3). La morfología se realiza en un portaobjetos.

Otro instrumento disponible para el análisis microscópico del semen es la cámara de Neubauer (Ilustración 2. Cámara de Neubauer). Este instrumento es utilizado sobre todo para contar células sanguíneas, dada la precisión de este instrumento. Es mucho más común el uso de la cámara de Makler en clínicas de reproducción asistida, debido a que es mucho más sencillo de usar. A pesar de que la cámara de Neubauer es más precisa a la hora de contar y diferenciar espermatozoides, no se aprecian diferencias significativas en la concentración al usar una cámara u otra (4).



Ilustración 1. Cámara de Makler (4)



Ilustración 2. Cámara de Neubauer (4)

La cámara de Makler es una pieza dividida en 10 filas por 10 columnas que miden 1 * 1 mm y 0,01 mm de profundidad, de manera que tenemos un volumen de 0,01 mm³, que es igual a 0,01 µL (**Ilustración 3. Vista real Cámara de Makler**). Al introducir en la cámara 100 µL de muestra se disponen 0,001 µL en cada fila y columna, o una millonésima parte de mL, por lo que el número de espermatozoides en una fila es el número de la concentración de espermatozoides en millones por mL. Ej.: si en una fila o columna se han contado 20 espermatozoides, quiere decir que la concentración de esa muestra es de 20 millones de espermatozoides por mL.

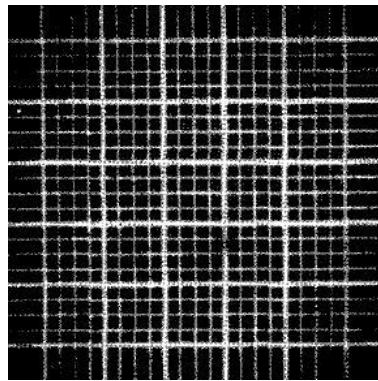


Ilustración 3. Vista real Cámara de Makler (5)

Los parámetros microscópicos que se analizan en un seminograma son:

Concentración: analizando en la cámara 100 µL de semen, podemos saber la concentración que tiene la muestra de ese paciente. Multiplicando el valor de la concentración por el volumen del eyaculado se obtiene el número de espermatozoides totales.

Movilidad: se cuentan 100 espermatozoides y se anota su movilidad, diferenciándolos en móviles, inmóviles, y móviles no progresivos (espermatozoides con un claro movimiento pero que no se desplazan o que lo hacen de una manera anormal, como en círculos o a una velocidad muy baja). Multiplicando el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos por el número de espermatozoides totales, se obtiene el número de espermatozoides móviles totales, valor que es importante a la hora de elegir un tratamiento de reproducción asistida.

Morfología: con la ayuda de un portaobjetos se realiza un frotis y se tiñe la muestra mediante un *Diff-Quik*. Una vez seca la muestra, se cuentan 100 espermatozoides y se apuntan los porcentajes de espermatozoides normales y anormales, diferenciando estos

últimos en que parte o partes del espermatozoide tienen la anomalía (cabeza, parte media o cola).

Una vez analizados todos estos parámetros se procede a dar un diagnóstico a los pacientes, indicando cuál es la posible causa de infertilidad y el tratamiento recomendado que deben seguir.

1.3 Factor masculino y patologías (causas y tratamientos)

La esterilidad masculina puede ser muy diversa, dependiendo de que parámetro es el que causa el problema. Según el estudio del seminograma podemos determinar si el problema está en la concentración (que no haya suficiente número de espermatozoides), en la movilidad (que no se muevan bien y no lleguen a fecundar el óvulo) o en la morfología (hay suficientes y se mueven bien, pero la calidad de estos es muy mala) (6).

1.3.1 Alteraciones en el número de espermatozoides

Es algo frecuente que en el seminograma no se vean espermatozoides, denominándose la muestra como azoospermica (**Ilustración 4.** Diferentes tipos de alteraciones en la concentración de). Esto se debe a dos motivos principales: que no se produzcan los espermatozoides, o que no pasen al semen debido a una obstrucción.

Aproximadamente el 70% de los casos de azoospermia se debe a un motivo secretor. Las causas pueden ser muy diversas, como por ejemplo que hayan surgido problemas en el desarrollo del embrión y se hayan desarrollado mal los testículos o la criptorquidia. Esto es una anomalía en la cual alguno de los dos testículos o ambos no desciende de manera correcta.

Otra posible causa es la exposición a fármacos relacionados con la quimioterapia, puesto que pueden afectar a los testículos, impidiendo que realicen su función. Enfermedades como la meningitis o las paperas también pueden afectar al desarrollo de los espermatozoides, dificultando así su formación.

En cuanto a factores genéticos debemos destacar algún fallo o pequeña delección en el cromosoma “Y, o el síndrome de Klinefelter, que quien lo padece tiene un cromosoma “X” de más. En ambos casos es algo que afecta directamente a los testículos (7).

También puede ocurrir que el origen de la azoospermia secretora sea un trastorno hormonal. Un déficit de testosterona o FSH conlleva un mal funcionamiento de la gónada masculina. Por el contrario, un aumento repentino de esas hormonas debido al consumo de anabolizantes también puede provocar una disfunción testicular (6).

Si hablamos de tratamientos de la azoospermia secretora, la que es causa por un trastorno hormonal es reversible (8). La solución en un mal funcionamiento hormonal es suministrar la hormona correspondiente para reactivar así la espermatogénesis. Por otro lado, si se deja de consumir anabolizantes, las gónadas podrían recuperar su funcionamiento normal (9).

Si hablamos de una azoospermia obstructiva, podemos decir que es una enfermedad congénita, que ocurrió en nuestro desarrollo embrionario. Si nos realizamos una vasectomía, el resultado es este tipo de azoospermia. Cualquier inflamación en los conductos seminales o testículos también podrían originar esta patología. En cuanto al tratamiento sería necesario realizar una biopsia testicular para asegurarse de que se producen espermatozoides y confirmara que la azoospermia es obstructiva (10).

La oligozoospermia u oligospermia (**Ilustración 4. Diferentes tipos de alteraciones en la concentración de**) ocurre cuando hay espermatozoides, pero la cantidad está por debajo de los 15 millones por mL. Si la concentración es menor a 1 millón se considera grave, y si está comprendida entre 5 y 15 millones es leve. Entre esta patología y la azoospermia, se encuentra la criptoospermia (**Ilustración 4. Diferentes tipos de alteraciones en la concentración de**), donde la concentración de espermatozoides es menor a cien mil por mL (5).

Entre las causas se encuentran fallos hormonales, una mala alimentación, el consumo de sustancias tóxicas, diversas alteraciones testiculares, o una obstrucción de los conductos debido a inflamación o infección. Si la causa de la patología se desconoce, lo más recomendable es llevar una vida saludable, no ingerir sustancias tóxicas y seguir una buena alimentación.

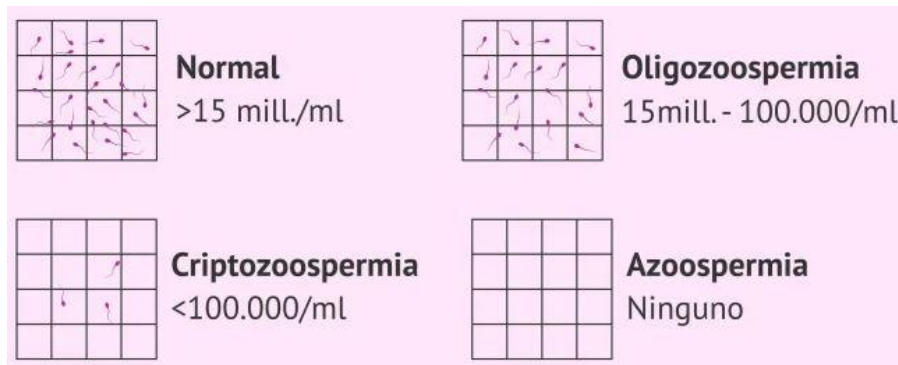


Ilustración 4. Diferentes tipos de alteraciones en la concentración de espermatozoides (11)

1.3.2 Alteración en la movilidad de espermatozoides

Si nos fijamos en la movilidad, según la OMS, una muestra que no llega al 32% de espermatozoides móviles progresivos y al 40% de movilidad total, se considera astenozoospermica (**Ilustración 5**. Tipos de movilidad de espermatozoides). En cuanto a las causas se puede destacar la mala alimentación, el consumo de sustancias tóxicas, la fiebre, e incluso la presencia de anticuerpos anti espermáticos (5).

Esto es una causa de infertilidad que proviene del sistema inmunológico. Estas inmunoglobulinas del tipo IgA e IgG detectan a los espermatozoides como cuerpos extraños y se adhieren a estos. Gracias al *Mar-Test* podemos ver si una muestra contiene estos anticuerpos gracias a que se forman aglutinaciones de espermatozoides.

En cuanto al tratamiento para esto, se realizan capacitaciones de mejora espermática antes de proceder con un tratamiento de reproducción asistida. Con la capacitación se pretende recuperar los espermatozoides con mayor movilidad, actuando como sesgo para aquellos que son inmóviles y con el lavado se reduce el número de anticuerpos anti-espermatozoides que hay en la muestra de semen. El tratamiento para el resto de las causas es llevar un estilo de vida saludable.

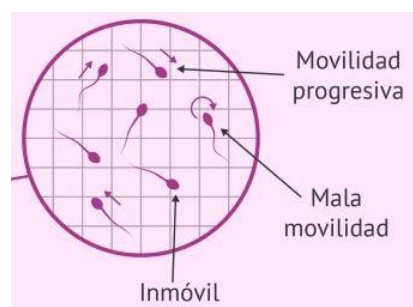


Ilustración 5. Tipos de movilidad de espermatozoides(11)

1.3.3 Alteración en la morfología de espermatozoides

Según la OMS una muestra normal se considera cuando el porcentaje de espermatozoides normales es mayor o igual al 4%. En caso de lo contrario la muestra se consideraría teratozoospermica (5). Las formas anormales más comunes son la cabeza demasiado alargada o redonda, la parte media engrosada, dos flagelos, flagelo en forma de espiral o el flagelo roto formando un ángulo visible.

Las causas de la teratozoospermia suelen ser alteraciones genéticas, aunque una exposición a tratamientos de quimioterapia podría propiciar esta patología (12). Mientras los otros parámetros no estén afectados, esta muestra podría terminar en embarazo sin algún problema. El tratamiento al igual que para las otras patologías, es llevar un estilo de vida saludable.

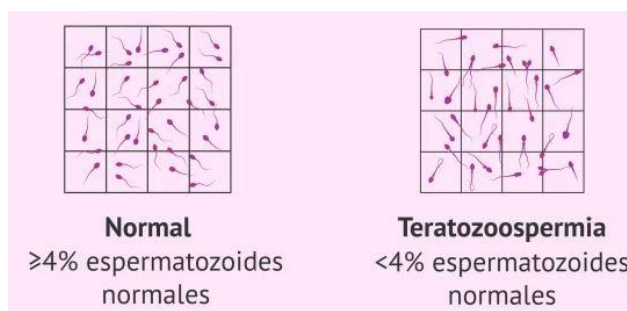


Ilustración 6. Comparación de una muestra de morfología normal frente a una muestra teratozoospermica (11)

1.3.4 Alteración en el volumen del eyaculado

La hipospermia ocurre cuando el volumen del semen eyaculado está por debajo de 1,5 mL. Las causas más comunes son las alteraciones en los conductos eyaculadores, debido a inflamación. Si esta patología está causada por algún problema en la vesícula germinal, se podría operar al paciente.

1.3.5 Alteración en la vitalidad de los espermatozoides

La necropermia hace referencia a un porcentaje de mortalidad de los espermatozoides superior al 42%. Con el test de tinción de nigrosina se tiñen los espermatozoides muertos, debido a que tienen la membrana rota y puede penetrar el tinte. Las causas pueden ser el consumo excesivo de sustancias tóxicas. El tratamiento por consiguiente es llevar un estilo de vida saludable.

1.3.6 Combinación de varias alteraciones

Si la muestra de semen es de mala calidad, es probable que nos encontremos varias patologías a la vez. Si una muestra tiene poca movilidad y poca concentración, es oligoastenospérmica, si tiene baja concentración y mala morfología, es

oligoteratospérmica. Si tiene poca movilidad y mala morfología, es astenoteratospérmica. Si coinciden las tres patologías, la muestra es oligoastenoteratospérmica.

1.4 Tratamientos de reproducción asistida

Dependiendo del diagnóstico que el paciente recibe, se le recomienda un tratamiento de reproducción u otro. En el caso de una oligospermia leve, se recomienda hacer una inseminación artificial, puesto que es una técnica sencilla y asequible para el paciente. En caso de una oligospermia grave y criptozoospermia, es más recomendable que se realice una técnica de fecundación in vitro, siendo más efectivo el ICSI.

En cuanto a la azoospermia obstructiva, lo mejor sería realizar una biopsia testicular y posteriormente un ICSI, puesto que las biopsias testiculares no suelen dar una buena concentración de espermatozoides para realizar una inseminación artificial.

Con la azoospermia secretora, el embarazo natural es posible si se solucionan las causas de la patología. Si posteriormente la calidad del semen no es buena, se valorará que tratamiento seguir.

Como la astenospermia afecta a la movilidad, no está recomendada la inseminación artificial. Si las técnicas de FIV e ICSI no diesen resultado, se valoraría recurrir a semen de donante.

Un paciente teratozoospérmico debería de poder tener un embarazo natural, puesto que ni la movilidad, ni la concentración se ven afectadas. Sin embargo, si la teratozoospermia es de origen genético, no habría un tratamiento específico, ya que la calidad del semen es mala, sin importar la técnica empleada.

Si una persona sufre de hipospermia, no debería suponer un problema para conseguir el embarazo de manera natural. Si la concentración es buena, no necesitaría ningún tratamiento.

1.5 Técnicas de capacitación

La capacitación se define como la etapa final del desarrollo de un espermatozoide en la cual adquiere la capacidad de fecundar a un óvulo. Esto ocurre cuando el espermatozoide entra en contacto con las criptas oviductales, que desencadena la hiperactivación y el flagelo produce un movimiento asimétrico, amplio y acelerado.

Posteriormente se adhieren las membranas plasmáticas del espermatozoide y del oocito y se fusionan. A partir de aquí mediante un mecanismo de señales proteómicas, el espermatozoide adquiere la capacidad de unirse a la zona pelúcida y de llevar a cabo la reacción acrosómica, donde se fusionan las membranas plasmáticas del ovulo y la membrana externa del acrosoma (13).

Antes de realizar cualquier TRA, es necesario preparar el semen y conseguir la mayor cantidad de espermatozoides móviles posibles para la inseminación artificial, y los mejores espermatozoides móviles progresivos para el ICSI. Para ello una vez analizado el semen, se procede a su capacitación in vitro:

Swim-up: se mezcla la muestra con *Fert* en una proporción 1:1 y se lava la muestra mediante un centrifugado a 1800 rpm durante 10 minutos. Se retira todo el sobrenadante posible y se añade aproximadamente 0,8 mL de *Fert*, dejando el tubo inclinado en el incubador durante varios min para que los espermatozoides móviles “naden hacia arriba” del pellet. Se toma un volumen final de 0,3 mL de muestra para el ICSI (14).

Si el semen tiene un porcentaje alto de espermatozoides móviles se deja el tubo en el incubador unos 10 o 15 minutos para no concentrar mucho la muestra, puesto que dificultaría la inmovilización de estos en el ICSI; y si la muestra es oligo o muy asteno, se deja hasta 45 minutos o una hora capacitando.



Ilustración 7. Técnica de swim-up (11)

Gradientes: se preparan varios tubos cónicos (depende del volumen de semen. Ej.: si tenemos 3 mL, se repartirán en 4 tubos con 0,75 mL cada uno) donde se añadirán los 2 gradientes de densidad diferentes y el semen, en proporción 1:1:1 en volumen. Primero se echa el gradiente del 90% (aproximadamente) despacio y que baje por la pared del

tubo, haciendo un rastro. Posteriormente se echa el gradiente de 45% (aproximadamente, estos porcentajes dependen de la marca y de la clínica de reproducción) por ese rastro, procurando que no se mezclen. Por último, se echa el semen también por la pared lentamente y se repite el procedimiento para los otros tubos.

Los tubos se centrifugan a 1400 rpm durante 15 min, se rescata el pellet de los tubos y se juntan en un tubo aparte (si el semen es de congelado en bloque, se puede hacer swim up para mejorar la calidad de la muestra). Esta técnica se usa generalmente para las inseminaciones artificiales, debido a que los gradientes dejan el semen mucho más limpio.

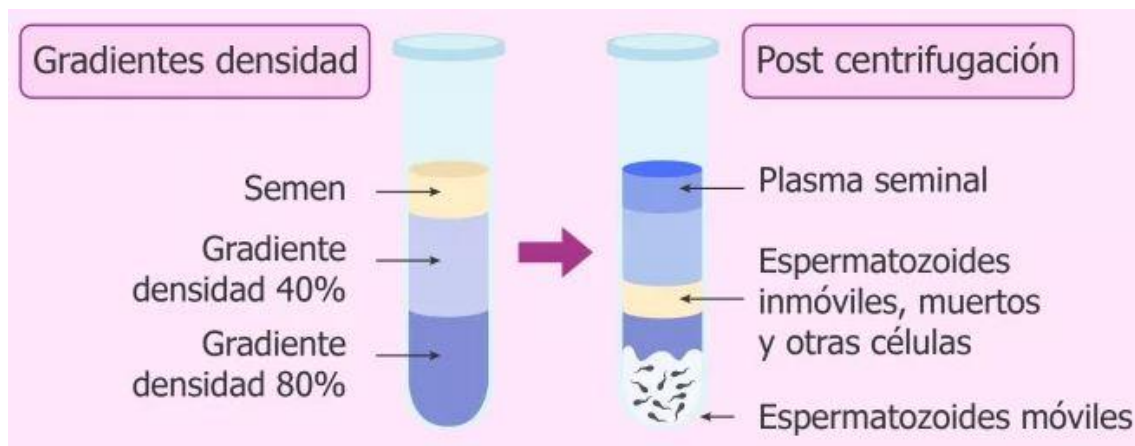


Ilustración 8. Técnica de capacitación por gradientes de densidad (11)

Lavado: se mezcla la muestra con *Fert* en una proporción 1:1 y se lava la muestra mediante un centrifugado a 1800 rpm durante 10 minutos. En los casos con una concentración muy baja de espermatozoides para capacitación, se realiza un lavado. Tras el centrifugado se deja un poco de sobrenadante donde esperamos encontrar los móviles (15).

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se tiende como objetivo realizar un estudio estadístico sobre el impacto que tienen tanto las diferentes técnicas de capacitación como los factores etiológicos sobre la calidad seminal en tratamientos de reproducción asistida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el estudio, se utilizó una base de datos exportada del programa Sivis (IVI) con N = 1042 tratamientos de reproducción asistida realizados en Almería entre 2017 y 2020. Estos datos incluyen información sobre el tipo de tratamiento, las etiologías masculinas y femeninas, edad de los pacientes, origen (paciente o donante) y estado (fresco o congelado) del semen, la técnica de capacitación (swim-up, gradientes o solo lavado), la concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides tanto en fresco como tras la capacitación, el número de espermatozoides totales y totales móviles tanto en fresco como posterior a su capacitación, el volumen del eyaculado.

Estos datos al exportarse en formato “.xls” pueden ser leídos por el programa estadístico SPSS, que es el que vamos a usar para realizar el estudio. El SPSS es un programa estadístico que permite realizar hojas de cálculo muy amplias y realizar una gran cantidad de análisis estadísticos como estadística descriptiva (medias y frecuencias), estadística bivariada (análisis de varianza) y regresión lineal entre otras (16).

En un primer lugar se realizan los estadísticos descriptivos para obtener una media de todos los datos y poder trabajar con ellos. Una vez realizados, se procede a comparar las medias para ver si hay diferencia en el número total de espermatozoides móviles progresivos según la técnica de capacitación empleada y según la etiología del paciente.

3.1 Estadísticos descriptivos

En este apartado se analizaron diferentes medias y tablas de frecuencias con nuestros datos. Con la estadística descriptiva se pretende organizar los datos de una manera más visible con el uso de tablas o gráficas, o medias de un conjunto de datos para facilitar su uso (17).

En primer lugar, se realizó un estadístico descriptivo de las técnicas de capacitación, para ver la frecuencia de cada técnica. Se realizó una tabla cruzada entre las técnicas de capacitación y el estado del semen. Después de esto, se analizaron las medias

del número de espermatozoides móviles en fresco y tras el capacitado, y la técnica empleada. Tras esto se enfrentó la concentración en fresco y tras la capacitación, frente al estado de los espermatozoides. Se analizó la frecuencia de toda la etiología masculina por grupos de edad. Finalmente, se estudió el número de técnicas de capacitación empleadas por cada etiología masculina.

3.2 Comparación de medias

Para realizar esto se tuvieron en cuenta los valores perdidos. En algunos casos había datos sobre qué técnica se usó en ese tratamiento, pero no del número de espermatozoides progresivos. Esto se corrigió en un apartado dentro del programa “seleccionar casos”, filtrando los datos según unas condiciones impuestas.

Para la comparación de medias se realizaron una serie de tablas ANOVA (técnica de análisis de varianza) las cuales mediante un proceso de contraste de hipótesis se comparan dos o más medias para saber si existen diferencias estadísticamente significativas entre estas (18).

En primer lugar, se compararon las medias del total de móviles progresivos según la técnica de capacitación empleada. En segundo lugar, se compararon las medias de la concentración tras el capacitado diferenciadas según el estado del semen. Se analizó también las medias del total de espermatozoides móviles según el estado del semen. Por último, se seleccionaron las etiologías en las que se usaron dos o más técnicas de capacitación para comparar las medias del total de espermatozoides móviles progresivos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis descriptivos

En la **Tabla 1**. Frecuencia de cada técnica de capacitación podemos apreciar el número de veces que aparece cada técnica de capacitado en nuestra base de datos. Con un casi 80%, la técnica más empleada es el swim-up, mientras que la técnica de gradientes no llega al 1%. Hay un porcentaje del 13% aproximadamente en el cual no se ofrecen datos respecto a esta variable.

Tabla 1. Frecuencia de cada técnica de capacitación

		CAPACITACIÓN			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Técnica	Indeterminada	134	12,9	12,9	12,9
	Swim-up	821	78,8	78,8	91,7
	Gradientes	9	,9	,9	92,5
	Lavado	78	7,5	7,5	100,0
	Total	1042	100,0	100,0	

En la **Tabla 2**. Frecuencia de técnicas de capacitación agrupadas según el estado del semen podemos ver como se organizan los tres tipos de técnicas frente al estado del semen, observando como la técnica de gradientes solo se ha usado en semen fresco. Un total de 6 datos no tenían información sobre el estado del semen.

Tabla 2. Frecuencia de técnicas de capacitación agrupadas según el estado del semen

Tabla cruzada Capacitación*Estado semen

		Estado semen			Total
		Fresco	Congelado		
Técnica	Indeterminada	0	112	22	134
	Swim-up	5	723	93	821
	Gradientes	0	9	0	9
	Lavado	1	54	23	78
Total		6	898	138	1042

En la **Tabla 3**. Frecuencias de los rangos de edad podemos observar que solo tenemos conocimiento de 908 datos sobre la edad de los pacientes, y que más de la mitad de estos se encuentran entre 30 y 40 años.

Tabla 3. Frecuencias de los rangos de edad

		Edad del hombre			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Rangos	[20, 30]	54	5,9	5,9	5,9
	(30, 40]	491	54,1	54,1	60,0
	(40, 50]	271	29,8	29,8	89,9
	(50,60]	27	3,0	3,0	92,8
	>60	65	7,2	7,2	100,0
Total		908	100,0	100,0	

En la **Tabla 4**. Frecuencias cruzadas entre el origen y el estado de los espermatozoides podemos observar cómo cerca del 95% del total del semen de paciente, tiene un estado fresco. Por otro lado, el 68% del semen de donantes estaba congelado.

Tabla 4. Frecuencias cruzadas entre el origen y el estado de los espermatozoides

Tabla cruzada origen*estado de espermatozoides

		Estado		Total
		Fresco	Congelado	
Origen	Paciente	748	35	783
	Donante	38	81	119
Total		786	116	902

En la **Tabla 5**. Uso de pentoxifilina tenemos un registro de 570 datos, en los que el 98% de los casos no se ha usado pentoxifilina para mejorar el movimiento espermático.

Tabla 5. Uso de pentoxifilina

		PENTOXIFILINA			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Sí	11	1,1	1,9	1,9
	No	559	53,6	98,1	100,0
	Total	570	54,7	100,0	
Perdidos	Sistema	472	45,3		
Total		1042	100,0		

En la **Tabla 6**. Procedencia del semen podemos ver que el 97% de los datos tienen una procedencia de eyaculado.

Tabla 6. Procedencia del semen

		SEMEN ESPECIAL			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Eyaculado	1007	96,6	97,2	97,2
	Biopsia testicular	29	2,8	2,8	100,0
	Total	1036	99,4	100,0	
Perdidos	Sistema	6	,6		
Total		1042	100,0		

En la **Tabla 7**. Frecuencia del uso de pentoxifilina según la procedencia del semen observamos que solo se ha usado pentoxifilina en semen cuya procedencia era el eyaculado.

Tabla 7. Frecuencia del uso de pentoxifilina según la procedencia del semen

Tabla cruzada SEMEN ESPECIAL*PENTOXIFILINA

		PENTOXIFILINA		Total
		Sí	No	
SEMEN ESPECIAL	Eyaculado	11	544	555
	Biopsia testicular	0	15	15
Total		11	559	570

En la **Tabla 8**. Frecuencias de etiologías agrupadas por rangos de edad podemos ver el número de etiologías que hay en cada rango de edad. Si dividimos el número de etiologías de cada rango entre el número total de casos para ese rango (tabla 3), obtendremos el porcentaje de etiologías que poseen. De esta manera, observamos la existencia de alguna etiología en el 50% de pacientes entre 20 y 30 años, un 36% entre 30 y 40, un 40% de etiologías para aquellos que se encuentran entre 40 y 60 años, y un 4% para aquellos hombres con más de 60 años.

No es de extrañar que el grupo con mayor porcentaje de etiologías es el más joven puesto que, al estar en la mejor edad fértil, es poco probable que la calidad del semen sea mala, debiendo haber alguna etiología que impida la fertilidad. Por otro lado, con las personas de más edad pasa lo contrario. Al ser mayores no es necesario una etiología en concreto para afectar su fertilidad, simplemente la calidad del semen es mala debido a la edad.

Tabla 8. Frecuencias de etiologías agrupadas por rangos de edad

Tabla cruzada Etiología masculina*Edad

Etiología	Edad					Total
	[20, 30]	(30, 40]	(40, 50]	(50, 60]	>60	
Normozoospermia	4	13	8	0	0	25
Azoospermia	4	19	14	4	0	41
Criptozoospermia	0	10	2	0	0	12
Astenozoospermia	1	13	20	0	0	34
Astenoteratozoospermia	3	20	15	0	0	38
Oligozoospermia	2	12	6	0	0	20
Oligoastenozoospermia	1	11	9	1	0	22
Oligoteratozoospermia	0	4	2	0	0	6
Oligoastenoteratozoospermia	7	32	21	0	3	63
Teratozoospermia	3	17	6	0	0	26
Patología seminal obstructiva	0	4	0	5	0	9
Patología seminal secretora	0	2	0	1	0	3
FISH anormal	0	3	2	0	0	5
Hipospermia	0	0	1	0	0	1
Otra patología seminal	0	9	1	0	0	10
Traslocación	0	1	1	0	0	2
Otra alteración de cariotipo	0	7	1	0	0	8
Portador de enfermedad genética	2	0	0	0	0	2
Otras etiologías	0	2	0	0	0	2
Total	27	179	109	11	3	329

En la **Tabla 9**. Media del número total de espermatozoides móviles progresivos antes y después del capacitado observamos que las medias del número total de espermatozoides móviles progresivos son muy similares en cada técnica de capacitación. Esto quiere decir que el uso de una técnica de capacitación en concreto, por sí sola no va a afectar a la calidad del semen.

Tabla 9. Media del número total de espermatozoides móviles progresivos antes y después del capacitado

		Informe	
Técnica		Total móviles progresivos en fresco	Total móviles progresivos tras capacitación
Indeterminada	Media	36,3069	4,0403
	N	119	119
	Desv. Desviación	35,69368	4,04048
Swim-up	Media	45,8806	3,3821
	N	741	741
	Desv. Desviación	51,82980	3,29305
Gradientes	Media	30,9956	3,4067
	N	9	9
	Desv. Desviación	20,47112	3,60603
Lavado	Media	43,6822	3,5871
	N	49	49
	Desv. Desviación	55,70793	5,25522
Total	Media	44,3763	3,4786
	N	918	918
	Desv. Desviación	50,09908	3,52987

En la **Tabla 10**. Medias de la concentración en fresco y tras capacitado agrupadas según la procedencia del semen podemos observar las medias de la concentración dependiendo de la procedencia del semen. En el caso de fresco, observamos que la media de concentración es muy superior cuando la procedencia es de eyaculado frente a biopsia testicular.

Tabla 10. Medias de la concentración en fresco y tras capacitado agrupadas según la procedencia del semen

		Informe	
SEMEN ESPECIAL		Concentración en fresco	Concentración tras capacitado
Eyaculado	Media	40,4131	12,3484657236
	N	985	919
	Desv. Desviación	30,64060	12,1747245036
Biopsia testicular	Media	,0135	,1
	N	26	1
	Desv. Desviación	,01765	.
Total	Media	39,3741	12,3351521739
	N	1011	920
	Desv. Desviación	30,91299	12,1747976997

En la **Tabla 11**. Medias de la concentración según el estado del semen antes y después del capacitado podemos ver como varía la media concentración tanto en fresco como tras el capacitado según el estado del semen. La media de la concentración en fresco en el semen congelado es muy superior a la del semen fresco puesto que, para poder congelar muestra, esta tiene que cumplir un mínimo de requisitos. Tras la capacitación del semen, podemos ver que aquí la media de concentración en fresco es superior a la de congelado. Esto es debido que, al congelar y descongelar la muestra, muchos espermatozoides han muerto.

Tabla 11. Medias de la concentración según el estado del semen antes y después del capacitado

		Informe	
Estado semen		Concentración en fresco	Concentración tras capacitado
Fresco	Media	39,6943	12,8391297208 5385
	N	812	812
	Desv. Desviación	29,84584	12,4852542620 48946
Congelado	Media	63,1131	8,62585669781 932
	N	107	107
	Desv. Desviación	24,43012	8,67052201186 9090
Total	Media	42,4210	12,3485745375 4079
	N	919	919
	Desv. Desviación	30,20504	12,1746144630 35855

En la **Tabla 12**. Medias del número total de espermatozoides móviles progresivos en fresco agrupados por edad observamos de manera muy clara como a medida que aumenta la edad, se va disminuyendo el número de espermatozoides móviles progresivos en fresco.

Tabla 12. Medias del número total de espermatozoides móviles progresivos en fresco agrupados por edad

Informe

Total móviles progresivos en fresco

Edad	Media	N	Desv. Desviación
[20, 30]	48,9822	67	58,52400
(30, 40]	44,3531	531	52,56233
(40, 50]	43,0662	300	47,54444
(50, 60]	13,2376	29	20,13741
>60	2,1850	4	3,67841
Total	43,1212	931	50,94086

4.2 Comparación de medias

En la **Tabla 13**. Comparativa de las medias del total de espermatozoides progresivos móviles según la técnica de capacitación podemos comprobar que no hay una diferencia significativa entre las medias del número total de espermatozoides móviles progresivos, puesto que el p valor es mayor que 0,05. Con esto podemos decir que estadísticamente hablando no difiere mucho con qué técnica se realice el capacitado.

Tabla 13. Comparativa de las medias del total de espermatozoides progresivos móviles según la técnica de capacitación

ANOVA

Total móviles progresivos tras capacitación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,016	2	1,008	,085	,919
Dentro de grupos	9464,401	797	11,875		
Total	9466,417	799			

En la **Tabla 14**. Comparativa de medias de la concentración entre los estados del semen se observa un p valor menor a 0,05, lo que indica que las diferencias en las medias de concentración tras el capacitado según si el semen es fresco o congelado son muy significativas. Esto quiere decir que el hecho de que el semen sea fresco o congelado repercute en su concentración.

Tabla 14. Comparativa de medias de la concentración entre los estados del semen

ANOVA

Concentración tras capacitado

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1678,276	1	1678,276	11,452	,001
Dentro de grupos	134388,819	917	146,553		
Total	136067,096	918			

En la **Tabla 15**. Comparativa de medias de concentración en fresco según la procedencia del semen observamos que el p valor es 0 o muy próximo a 0, lo que nos indica que la concentración en fresco depende mucho de la procedencia del semen, como pudimos observar en la **Tabla 10**. Medias de la concentración en fresco y tras capacitado agrupadas según la procedencia del semen.

Tabla 15. Comparativa de medias de concentración en fresco según la procedencia del semen

ANOVA

Concentración en fresco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	41344,015	1	41344,015	45,156	,000
Dentro de grupos	923824,764	1009	915,585		
Total	965168,779	1010			

En la **Tabla 16**. Comparativa de medias del número espermatozoides móviles progresivos en fresco según la edad se ve muy claramente que el número total de espermatozoides móviles progresivos depende de la edad. Cuanta más edad tenga el paciente, menor será la cantidad de espermatozoides móviles progresivos, como vimos en la **Tabla 12**. Medias del número total de espermatozoides móviles progresivos en fresco agrupados por edad.

Tabla 16. Comparativa de medias del número espermatozoides móviles progresivos en fresco según la edad

ANOVA

Total móviles progresivos en fresco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	35709,315	4	8927,329	3,477	,008
Dentro de grupos	2377613,653	926	2567,617		
Total	2413322,969	930			

En la **Tabla 17**. Medias de capacitación tras el capacitado agrupaos por capacitación y estado del semen vemos que la media de la concentración es superior en las muestras que son en fresco frente a las muestras congeladas. Según estos resultados, usar la técnica de lavado en muestras congeladas es más efectivo que usar el swim-up (no tenemos referencias de gradientes), puesto que la media de la concentración es mayor cuando se aplica solo un lavado a la muestra.

Tabla 17. Medias de capacitación tras el capacitado agrupaos por capacitación y estado del semen

		Estado semen * Capacitación			
Variable dependiente: Concentración tras capacitado					
Estado semen	Capacitación	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Fresco	Swim-up	12,713	,469	11,792	13,635
	Gradientes	11,013	4,029	3,105	18,922
	Lavado	13,305	1,935	9,506	17,104
Congelado	Swim-up	7,834	1,360	5,164	10,503
	Gradientes	. ^a	.	.	.
	Lavado	11,570	3,822	4,067	19,073

a. Esta combinación de niveles de factores no se observa, por lo tanto, la media marginal de población correspondiente no se puede estimar.

En cuanto a la etiología de la **Tabla 18**. Medias del total del total de espermatozoides móviles progresivos agrupadas según la etiología y la técnica de capacitación, se han seleccionado los casos que tuviesen como mínimo datos de dos técnicas de capacitación ya que, en caso de lo contrario, no habría nada que comparar. Podemos mencionar que en la patología de astenozoospermia, es mejor realizar la capacitación por gradientes, puesto que la media de esta técnica es considerablemente mayor que las demás. En pacientes azoospermicos se pueden realizar tanto el swim-up, como el lavado (no tenemos datos de gradientes), porque las medias del número total de espermatozoides móviles progresivos son muy similares.

En pacientes con una patología de astenoteratozoospermia, es preferible usar tanto swim-up como gradientes frente a solo un lavado. Para la patología oligoastenozoospermia observamos que solo un lavado es más efectivo que el swim-up a la hora de recuperar espermatozoides. En pacientes con una oligoastenoteratozoospermia podemos decir que es preferible usar la técnica del swim-up a la hora de hacer la capacitación, pero las otras técnicas también ofrecen resultados confiables.

Tabla 18. Medias del total del total de espermatozoides móviles progresivos agrupadas según la etiología y la técnica de capacitación

ETIOLOGIA MASCULINA * CAPACITACIÓN

Variable dependiente: Total móviles progresivos tras capacitación

ETIOLOGIA MASCULINA	CAPACITACIÓN	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Azoospermia	Swim-up	2,997	,582	1,850	4,144
	Gradientes	.ª	.	.	.
	Lavado	2,940	1,483	,016	5,864
Astenozoospermia	Swim-up	2,658	,411	1,848	3,469
	Gradientes	5,520	2,097	1,385	9,655
	Lavado	,900	1,483	-2,024	3,824
Astenoteratozoospermia	Swim-up	1,688	,389	,920	2,456
	Gradientes	1,680	2,097	-2,455	5,815
	Lavado	,440	1,483	-2,484	3,364
Oligoastenozoospermia	Swim-up	,629	,509	-,373	1,632
	Gradientes	.ª	.	.	.
	Lavado	1,075	1,483	-1,849	3,999
Oligoastenoteratozoospermia	Swim-up	,628	,332	-,025	1,282
	Gradientes	,460	2,097	-3,675	4,595
	Lavado	,265	1,483	-2,659	3,189

5. CONCLUSIÓN

En el presente TFM se analizó una base de datos de N=1042 exportada de Sivis, con información muy detallada de protocolos de pacientes masculinos en la clínica IVI de reproducción asistida de Almería, entre 2017 y 2020. Mediante estudios estadísticos realizados con el programa SPSS de frecuencias, tablas cruzadas, análisis de medias y de varianza se pudo ver el impacto que tienen algunos factores como la capacitación, la etiología, la edad o el estado del semen, sobre la calidad del semen.

Con las tablas de frecuencias y tablas cruzadas se observó que la técnica de capacitación más usada es el Swim-up, tanto para el semen en fresco como el congelado. También se mostró que más de la mitad de los pacientes corresponden a un rango de edad entre 30 y 40 años. Por un lado, descubrimos que la mayoría del origen del semen de paciente es fresco mientras que, en más de la mitad del origen de donantes, el semen estaba congelado.

Por otro lado, se observó que se usó pentoxifilina solo en una mínima parte del total, y que ésta se usó solamente en semen de eyaculado, que es casi el total de la procedencia del semen. Finalmente se vio el porcentaje de etiologías por cada rango de edad, resultando que el grupo más joven era el que mayor porcentaje de etiologías presentaba, justo al contrario que los pacientes de mayor edad.

En cuanto al semen en fresco, se demostró que la edad del paciente es inversamente proporcional al número total de espermatozoides progresivos móviles y en definitiva a la calidad seminal. También se pudo afirmar que la concentración en muestras de eyaculado es muy superior a la de muertas de biopsia. Por último, se mostró que la concentración del semen congelado era significativamente mayor que la concentración en fresco.

Si hablamos de muestras tras la capacitación, cabe mencionar que la concentración en muestras de semen en fresco es mayor que la concentración en muestras congeladas, puesto que, en estas debido al estrés térmico, se habrían perdido espermatozoides. Además, se puede afirmar que, estadísticamente hablando, es más eficaz usar la técnica de lavado en muestras congeladas que el swim-up gracias a la comparativa de medias.

Para finalizar, también se demostró que, dependiendo de la etiología, es más efectivo usar una técnica de capacitación u otra para obtener el mayor número de espermatozoides móviles progresivos, y por consiguiente un mayor porcentaje de éxito en los tratamientos de reproducción asistida.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos en primer lugar a mi tutora del trabajo María Cruz por ayudarme en todo momento y dedicarme el máximo de su tiempo disponible a pesar de la situación.

Agradecimientos a Ángel Ruiz-Castizo Córcoles, embriólogo de IVI Almería, por formarme y ayudarme a conseguir una visión detallada del funcionamiento del laboratorio de andrología.

Agradecimientos a mi compañero de grado y amigo Ginés Rodríguez Castilla por ofrecerme sus conocimientos sobre estadística en el ámbito científico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Palma C, Vantman D. Infertilidad masculina: causas y diagnóstico. Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2021;32(2):180–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2021.01.004>
2. Seaman EK, Goluboff E, BarChama N, Fisch H. Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. Fertil Steril [Internet]. 1996;66(4):662–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58587-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58587-2)
3. Zuvela E, Matson P. Performance of four chambers to measure sperm concentration: results from an external quality assurance programme [Internet]. Vol. 41, Reproductive BioMedicine Online. Elsevier Ltd; 2020. p. 671–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.07.008>
4. Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. Actas Urol Esp. 2008;32(4):443–5.
5. OMS. Recolección y examen del semen humano. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 2001. 5–39 p.
6. Wilding M, Dale B. Sperm factor: What is it and what does it do? Mol Hum Reprod. 1997;3(3):269–73.
7. Rodríguez Salvador A. Valoración del diagnóstico clínico de los factores genéticos implicados en la infertilidad masculina. 2018;
8. Vendrell X. La genética reproductiva. Pensamiento Rev Investig e Inf Filosófica. 2017;73(276):527.
9. Qi L, Liu YP, Zhang NN, Su YC. Predictors of testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia: a review. J Int Med Res. 2021;49(4).
10. Committee P, Society A. The management of infertility due to obstructive azoospermia. Fertil Steril [Internet]. 2008;90(5 SUPPL.):121–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.096>
11. Barranquero Marta, Azaña Silvia, Villalobos Montserrat, Duque José Antonio QG. Reproduccionasistida.org [Internet]. 2014. Available from: reproduccionasistida.org
12. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. Andrology. 2017;5(5):845–62.
13. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Rev Colomb Ciencias Pecu. 2006;19(4):426–36.
14. Muraatori M, Tarozzi N, Carpentiero F, Danti S, Perrone FM, Cambi M, et al. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. Sci Rep. 2019;9(1):1–12.
15. Sánchez Prieto I, Sánchez Pozo MC, García Cobaleda I, Pascual Usandizaga P, Jiménez García MI, Castilla Alcalá JA. Lavado de semen en hombres con enfermedades infecciosas transmisibles Recomendación (2014). 2015;(September).
16. IBM. IBM SPSS Statistics 21 - Benutzerhandbuch. 2012;482.

17. Rendón-Macías ME, Villasís-Keever MÁ, Miranda-Navales MG. Estadística descriptiva. Rev Alerg México. 2016;63(4):397–407.
18. Pack PDF, Varianza LDELA, Enidos EDEC, Analysis V, Olmedo J, Ben R, et al. ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) Análisis de la varianza (ANOVA) ANOVA doble